

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

COMITÉ DE RÉDACTION

D^r **CALMETTE**, sous-directeur de l'Institut Pasteur;
D^r **LAVERAN**, membre de l'Institut de France;
D^r **L. MARTIN**, sous-directeur de l'Institut Pasteur;
D^r **ROUX**, directeur de l'Institut Pasteur;
D^r **VAILLARD**, membre de l'Académie de Médecine.

1
TOME TRENTE-CINQUIÈME

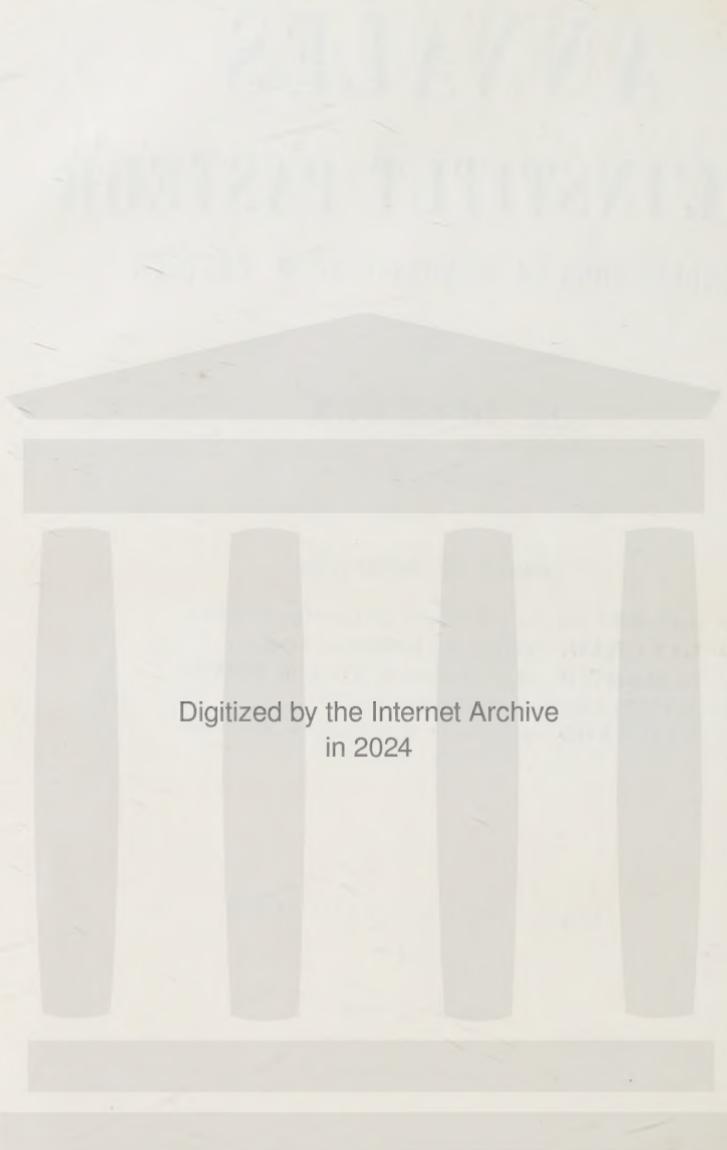
1921

AVRIL 4 PLANCHES

QR
A475
V.35
1921
PER

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADEMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6^e).



Digitized by the Internet Archive
in 2024

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ACTION

DE L'URÉASE DU SOJA SUR L'ORGANISME ANIMAL

par P. CARNOT, P. GÉRARD et M^{me} S. MOISSONNIER

Vauquelin, en 1825, avait découvert l'hydratation spontanée de l'urée en carbonate d'ammoniaque dans les milieux d'origine animale. Pasteur, en 1860, observait ce même phénomène sous l'influence des micro-organismes. Des études plus approfondies, poursuivies par Mascluer, 1898, puis Miquel, montraient que cette hydratation était l'œuvre d'une diastase, l'uréase, sécrétée par les micro-organismes. Successivement Shibata et Hofmeister, en 1904, et Tokenchi, en 1909, découvraient la présence de l'uréase dans les végétaux. En 1913, Armstrong et Horton reconnaissaient l'action strictement spécifique de l'uréase retirée du soja. Cette diastase, en effet, ne peut agir que sur l'urée, alors qu'elle est incapable d'hydrolyser des corps même très voisins de l'urée (urée substituée, acides aminés). Depuis, de nombreux auteurs ont étudié l'uréase. Fosse, en France, dans un important et très intéressant mémoire sur l'origine et la distribution de l'urée dans la nature, a essayé de définir le rôle physiologique de l'uréase dans les végétaux, cependant qu'en Amérique on s'attachait plutôt à connaître de façon précise son action *in vitro* sur l'urée dans des conditions de milieux différents. La très grande

activité de cette diastase, la facilité de sa préparation incitèrent les auteurs, et en particulier Folin, à s'en servir comme d'un moyen de dosage de l'urée dans les liquides de l'organisme et, depuis ce moment, innombrables sont les méthodes de dosage de l'urée, publiées par les élèves de Folin, qui utilisèrent l'action urolytique de cette diastase.

Les mêmes raisons qui avaient poussé les auteurs à utiliser l'uréase pour doser l'urée nous engagèrent à faire l'étude de ce ferment *in vivo*. En effet, sa grande résistance en milieu sanguin, son peu de sensibilité aux produits d'hydrolyse de l'urée, la facilité de dosage de l'élément attaqué par l'uréase et de l'ammoniaque produit devaient en faire, *a priori*, une excellente diastase d'étude *in vivo*. Grâce à la précieuse méthode de Fosse pour le dosage de l'urée par le xanthydrol, nous allons pouvoir suivre avec précision l'action et l'évolution de cette diastase introduite dans l'organisme; le dosage simultané de l' NH_3 dans le sang et les tissus nous permettent, d'autre part, de définir avec précision le mécanisme des accidents toxiques.

I. — Techniques de préparation.

La préparation de la solution diastasique dont nous nous servions pour injections est très simple. Nous employons de la farine de haricot de soja bien tamisée et fine, qu'ont bien voulu nous procurer MM. Heudebert et Chevalier avec une obligeance dont nous les remercions; puis nous la mélons à de l'eau dans une proportion de 4 à 10. Après avoir agité trois fois à vingt minutes d'intervalle, on met à filtrer ce mélange au bout d'une heure de macération et l'on obtient un liquide clair, légèrement opalescent, d'une grande activité diastasique.

CONSERVATION. — On peut conserver cette macération à la température du laboratoire (18°-20°) pendant deux ou trois jours sans que son titre baisse de façon appréciable; si l'on a soin d'ajouter à ce filtrat soit quelques cristaux de thymol, soit quelques centimètres cubes de toluène qui n'entraînent nullement l'action diastasique.

PURIFICATION. — Comme le procédé simple que nous

employons pour la préparation de la diastase nous donnait un liquide où un grand nombre de corps se trouvait entraîné en même temps que l'uréase, nous avons essayé de purifier notre diastase. Nous avons, pour cela, suivi les méthodes classiques que nous allons examiner :

1^o *Précipitation de la macération à 10 p. 100 par de l'alcool-éther à parties égales.* On ajoute à 10 parties de macération 90 parties d'alcool-éther : après une vive agitation et une filtration sur le vide, on récupère la diastase précipitée et, après l'avoir bien exprimée entre deux feuilles de papier filtre, on la séche définitivement sur des assiettes à la température du laboratoire. De tous les précipitants essayés (alcool, acétone, alcool-éther, alcool-acétone), c'est l'alcool-éther à parties égales qui nous a donné le meilleur résultat au point de vue de la facilité de la préparation et de la conservation de l'activité diastasique. Cette purification est évidemment imparfaite : car elle n'enlève qu'une partie des impuretés ; des albumines végétales dissoutes par l'eau sont, en effet, précipitées par l'addition d'alcool-éther et redissoutes à nouveau quand on reprend le précipité par l'eau. Néanmoins, lors de cette reprise, on constate une grande part d'insoluble et l'on sépare par centrifugation un assez volumineux précipité. Le pouvoir diastasique du liquide clair surnageant est malheureusement diminué de moitié par ce traitement. Si l'on tente une seconde purification par une nouvelle précipitation, le pouvoir diastasique est presque complètement détruit.

MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA DIASTASE. — Pour injecter aux chiens des liquides de pouvoir diastasique comparable, nous avons décidé de définir ainsi la valeur de notre liquide diastasique. Nous exprimons en milligrammes l'N.NH² produit par 1 cent. cube de macération filtrée aux dépens de 5 cent. cubes d'une solution d'urée à 1 p. 100 en une heure d'étuve à 37°. Les activités moyennes sont comprises entre 42 et 46 pour les macérations, entre 6 et 10 pour les diastases purifiées par précipitation. Lorsque nous faisons une injection aux animaux, nous faisons toujours entrer en ligne de compte l'activité de la diastase et le poids de l'animal. Si, pour un chien de 10 kilos, on injecte 50 cent. cubes de diastase de pouvoir 16, on injecte

$\frac{16 \times 50}{10} = 80$ de pouvoir diastasique par kilogramme. Si à un chien de 5 kilogrammes on veut injecter une dose comparable de diastase, alors que le liquide diastasique n'a qu'une activité de 8 au lieu de 16, on injectera une quantité de liquide suffisante pour avoir 80 de pouvoir diastasique par kilogramme, c'est-à-dire 50 cent. cubes. En effet $\frac{50 \times 8}{5} = 80$. De ce fait les expériences sont comparables entre elles.

STÉRILISATION DE LA DIASTASE. — Comme nous avions des injections à faire chez des chiens qui ne mouraient pas rapidement des suites de ces injections, il était indispensable d'injecter des liquides diastasiques stériles. Pour ce faire, nous avons étudié deux méthodes qui ne nous ont donné, d'ailleurs, que des résultats imparfaits.

1^o La *filtration sur bougie Chamberland*. La macération à 10 p. 100 laisse passer assez rapidement un liquide dont l'activité est abaissée des deux tiers.

2^o La *stérilisation par l'alcool* se fait au cours des opérations de purification par l'alcool-éther : on reprend le précipité par de l'alcool pur et on conduit, à partir de ce moment, les opérations de façon aseptique. On centrifuge, dans un tube stérile, on décante l'alcool et place le tube bouché avec son coton dans une cloche à vide. On évapore aussi bien que possible l'alcool contenu dans le tube à centrifuger, puis on reprend par une quantité appropriée d'eau stérile, on centrifuge à nouveau et c'est le liquide surnageant qui sert à l'injection. L'activité diastasique ne se trouve abaissée de ce fait que de moitié et la stérilisation du liquide est plus parfaite que par la filtration sur bougie Chamberland.

ATTÉNUATION DU POUVOIR DIASTASIQUE. — Désirant, au cours de nos expériences, utiliser comme contre-épreuve un liquide de macération dont seul le pouvoir diastasique aurait été annihilé, cependant que tous les autres corps constituants auraient été respectés, nous avons cherché à détruire ce pouvoir diastasique. Un seul moyen nous a pleinement réussi, c'est le chauffage à 90° au bain-marie pendant dix minutes. Le liquide de

macération devient complètement inactif, sans précipiter pour cela. Malheureusement le chauffage à 90° est un peu brutal et peut détruire ou modifier la composition de toxalbumines présentes dans la macération et dont nous aurions voulu conserver les effets. Par les autres procédés employés nous ne sommes arrivés qu'à des atténuations sans destruction de l'uréase.

Nous avons tout d'abord étudié le $(CN)_2Hg$ qui inactive complètement la diastase à la dilution de 1/1.000.

Diastase	Urée 1 p. 100	N.NH ₃ produit
0,5 (cyanure à 1/1.000). .	5	0,00
0,5 — 1/5.000). .	5	0,0014
0,5 — 1/10.000). .	5	0,0028
0,5 témoin.	5	0,0226

Au taux de 1/10.000 son activité est encore à peu près nulle : [mais, dès qu'elle est introduite dans l'économie, la dilution extrême à laquelle la diastase est portée lui permet de reprendre, malgré la présence de $(CN)_2Hg$, son activité première.]

Nous avons essayé ensuite l'addition de quantités ménagées de bases ou d'acides jusqu'à précipitation du liquide ; on laissait en contact plus ou moins longtemps, puis on neutralisait à nouveau soit avec la soude, soit avec l'acide. Nos additions de bases ou d'acides produisaient un volumineux précipité dans la macération et modifiaient de ce fait profondément les corps que nous voulions respecter avant d'avoir touché au pouvoir diastasique qui, après neutralisation, se montrait aussi actif qu'avant le traitement.

II. — Action de la diastase *in vitro* sur les humeurs de l'organisme.

Avant de procéder à des injections de diastase sur des animaux, nous avons étudié les modifications que pouvait subir son action en présence des produits de l'organisme. Nous avions, d'ailleurs, été précédés dans cette voie par de nombreux auteurs qui s'étaient servis de cette diastase comme d'un moyen de dosage de l'urée dans le sang et les tissus (Folin, Summer, etc.). L'uréase attaque avec facilité et une grande rapidité l'urée

contenue dans les liquides et les tissus de l'organisme pour la transformer complètement en carbonate d'ammoniaque.

RÔLE PROTECTEUR DU SANG ET DU SÉRUM SUR L'ACTIVITÉ DE LA DIASTASE. — A ce propos nous avons observé que le sérum sanguin joue *un rôle protecteur vis-à-vis de la diastase*. En étudiant l'action de la dilution sur l'activité diastasique, si l'on met en contact une certaine quantité de diastase et une certaine quantité d'urée et si l'on augmente par addition d'eau le volume total, on observe que plus le volume augmente (autrement dit, plus la dilution de la diastase est grande), plus l'activité de cette dernière diminue. Si, mettant en contact les mêmes quantités de diastase et d'urée et procédant aux mêmes dilutions, on prend soin d'ajouter une quantité donnée de sérum sanguin, la dilution n'a plus d'influence sur l'activité qui reste identique à elle-même ou peut même se trouver augmentée. Nous avons cherché quelle pouvait être la cause de cette influence protectrice du sérum.

Nous avons tout d'abord pensé à l'action favorisante d'un corps thermolabile et nous avons remplacé le sérum normal par du sérum chauffé à 56°, puis par du sérum chauffé à 65°. Ces deux sérums chauffés ont manifesté les mêmes propriétés que le sérum normal.

Pensant alors que c'était la réaction alcaline qui intervenait, nous avons remplacé le sérum par des quantités de NaOH inférieures, égales et supérieures à l'alcalinité du sérum. Cette alcalinité étant dosée, grossièrement il est vrai, par $\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}/10\text{N}$ en présence d'hélianthine, nous n'avons constaté aucune protection de l'action diastasique. Nous avons eu de meilleurs résultats en introduisant une légère acidité sous forme de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$. La diastase perd moins son activité quand on la dilue.

Il était logique de penser que le NaCl pouvait jouer un rôle : car son action favorisante sur les diastases, en particulier sur la lipase, a été maintes fois démontrée. Nous avons, dans une première expérience, remplacé le sérum par une solution de NaCl représentant des quantités inférieures, égales et supérieures aux quantités de NaCl contenues dans le sérum mis en expérience. Ceci ne nous a donné aucun résultat positif. Nous avons alors, dans une seconde expérience,

mis à dialyser du sérum à travers un sac de collodion jusqu'à ce que le liquide de dialyse soit complètement privé de NaCl. De cette façon nous avions un sérum privé de NaCl que nous avons essayé en même temps qu'un sérum non dialysé : nous avons obtenu les mêmes résultats avec les deux sérum. Ceci venait confirmer la première expérience et prouver que l'action du NaCl n'entrait pas en ligne de compte.

Par élimination nous devions admettre que c'est le sérum-albumine qui joue un rôle protecteur, et nous avons essayé d'obtenir les mêmes résultats avec de l'ovalbumine. Nous avons mis en expérience des quantités à peu près comparables en poids d'ovalbumine et de sérum-albumine et nous avons obtenu une protection de la diastase très nette, inférieure néanmoins avec l'ovalbumine. La sérum-albumine est plus protectrice.

Les tableaux suivants résument nos expériences. Nous avons toujours mis en expérience 0 c. e. 5 de macération diastasique de titre connu et semblable; on faisait agir sur 0 gr. 032 d'uréique pendant deux heures à l'étuve à 37° en présence de toluène. Nous avons alors étudié l'action diastasique de ces 0 c. e. 5 de diastase dilués dans 5 cent. cubes de liquide total (diastase non diluée) et dilués dans 30 cent. cubes de liquide total (diastase diluée). Nous nous sommes tenus à ces deux dilutions pour ne pas compliquer les chiffres et les rendre compréhensibles. Le tableau que nous donnons est un tableau récapitulatif qui condense en un seul chiffre la moyenne de plusieurs expériences :

	Diastase pure témoin	+ NaOH/10 N 7 c.c. 7	+ PO ₄ H ₂ K = 0 gr. 15	+ NaCl = 0,0001 à 0,010
Diastase 0,5 non diluée H ² O q. s. p. (5 c.c.)	—	—	—	—
	0,009	0,0091	0,0095	0,009
Diastase 0,5 diluée H ² O q. s. p. (30 c.c.)	—	—	—	—
	0,0014	0,0007	0,0035	0,0007

Dans ce tableau on constate la seule action protectrice du PO₄H₂K qui, malgré la dilution aqueuse, a pu conserver à la diastase une activité nettement supérieure. Un autre fait curieux à remarquer aussi est que la diastase non

diluée produit du carbonate d'ammoniaque en fonction du temps d'étuve: ainsi 0 c. c. 5 de diastase produisent 0,004 d'N.NH₂ en une heure et 0,009 en deux heures quand la dilution ne dépasse pas 5 cent. cubes; si nous atteignons la dilution de 30, la diastase produit 0,0012 en une heure et seulement 0,0014 en deux heures. Ce phénomène s'est reproduit quels que soient les corps ajoutés: en solution diluée la diastase produit en une heure la presque totalité de l'N.NH₂ qu'elle fournira définitivement.

Dans un second tableau, nous avons réuni nos essais faits avec le sérum :

	Diastase pure témoin	+ SÉRUM						Albumine d'oeuf
		1 c. c.	chauffé à 56° 1 c. c.	chauffé à 65° 1 c. c.	0 c. c. 5	dialysé	1 c. c.	
Diastase 0,5 non diluée (5 c. c.)	—	0,007	0,007	0,012	0,013	0,007	0,008	0,007
Diastase 0,5 diluée (10 c. c.)	—	0,00027	0,012	0,012	0,014	0,010	0,011	0,004

On voit qu'après dilution l'activité est pleinement conservée, quel que soit le sérum employé, qu'il soit chauffé à 56-65° ou non, ou privé de NaCl. Il est même à remarquer que les sérums chauffés à 56 et 65° étaient plus visqueux et paraissent avoir été, de ce fait, de meilleurs protecteurs de la diastase. L'ovalbumine s'est comportée de la même façon que le sérum, quoique moins nettement. Il est bien entendu que tous ces chiffres sont donnés, alcalinité du témoin déduite.

III. — Destinée de l'uréase injectée dans l'organisme.

a) RÉSISTANCE DE LA DIASTASE DANS L'ORGANISME. — [Un des principaux points auxquels nous nous sommes attachés a été de savoir quelles étaient les destinées de la diastase, une fois que celle-ci était introduite dans l'organisme. Combien de temps restait-elle active, quels étaient les organes où il était possible de déceler sa présence? Nous commencerons par présenter les recherches que nous avons faites après les *injections intraveineuses*, qui donnent les résultats les plus nets et les plus intéressants.

Pour reconnaître la présence de la diastase dans le sang ou dans un organe, nous mesurions son activité diastasique dans des conditions bien déterminées que nous allons décrire. Pour la recherche dans le sang, nous opérions toujours avec le sérum ; car celui-ci, étant incolore, nous permettait de faire des dosages volumétriques en présence d'hélianthine, ce qui simplifie beaucoup la méthode du dosage de l'ammoniaque. On prend 1 cent. cube de sérum que l'on met en contact avec 5 cent. cubes d'une solution d'urée à 1 p. 100 et 1 cent. cube de toluène comme antiseptique ; on laisse à l'étuve pendant vingt-quatre heures à 37° ; après quoi, on dose par SO_4H_2 1/10N, en présence d'hélianthine, la quantité d' N.NH_3 produit et l'on exprime les résultats en milligrammes d' N.NH_3 après avoir évidemment déduit de ces résultats l'alcalinité représentée par le sérum.

Dans le sang normal nous n'avons jamais trouvé d'action urolytique spontanée, tout au moins sensible à nos procédés d'investigation.

Nous mentionnerons trois expériences où nous avons cherché, de demi-heure en demi-heure, ce que devenait la diastase dans l'organisme, ou, tout au moins, comment se comportait l'activité diastasique du sang chez le chien injecté. Dans les deux premiers cas, nous avons injecté 60 cent. cubes de diastase, d'activité 12, à des chiens pesant 10 kilogrammes. Leur sang a été essayé avant l'injection au point de vue du pouvoir urolytique, puis essayé de demi-heure en demi-heure après l'injection. Le tableau suivant rendra compte des variations de l'activité diastasique.

	1 ^{re} EXPÉRIENCE activité	2 ^e EXPÉRIENCE activité
Sang avant l'injection	0	0
— 1/2 heure après	12,8	13
— 1 heure après	10	7,9
— 1 h 1/2 après	7,5	5
— 2 h. 1/2 après	6	5

La troisième expérience n'a pas été faite exactement dans les mêmes conditions ; l'activité diastasique a été prise en laissant

le sang deux heures à l'étuve au lieu de vingt-quatre heures. Les chiffres absolus sont moins forts; mais ils restent comparables entre eux et c'est là l'essentiel. Nous étions, d'ailleurs, forcés d'agir ainsi; car nous voulions suivre, en même temps, l'évolution de l'activité diastasique *in vivo* et *in vitro*. Pour ce faire, nous avons procédé de la sorte: Nous avons injecté à un chien de 22 kilogrammes 130 cent. cubes d'une diastase d'activité 12. Après une demi-heure, nous avons prélevé du sang; nous avons, après centrifugation, fait deux parties du sérum prélevé: une partie a été examinée immédiatement au point de vue de son activité diastasique; une autre partie a été abandonnée *in vitro* et, de demi-heure en demi-heure, nous avons suivi l'évolution de son activité diastasique. Nous avions donc, concurremment, deux expériences qui se poursuivaient: car, à chaque fois que nous prenions du sang au chien pour examiner l'activité diastasique de son sang, nous avions un point de comparaison avec l'activité diastasique du sang prélevé une demi-heure après l'injection et resté *in vitro*. On remarquera que, *in vivo*, la destruction s'est produite plus rapidement que *in vitro*. Si on mélange du sérum déjà prélevé depuis un certain temps (24 à 48 heures) sur l'animal et de la diastase, on remarque que l'activité diastasique subit une atténuation nulle et qui n'est nullement comparable à l'atténuation produite par le sang *in vivo*.

Ces expériences paraissent mettre en évidence l'action anti-diastasique du milieu sanguin vivant, action qu'il serait intéressant d'opposer à l'action protectrice que ce même sérum exerce sur la diastase *in vitro* quand on dilue celle-ci avec de l'eau. Cette seconde action est, d'ailleurs, d'un ordre tout à fait différent; et, comparable dans ses effets (qui se manifestent par une production plus ou moins grande d'N.NH₂ aux dépens de l'urée), elle n'est plus comparable au point de vue mécanisme de son action. Dans le premier cas, on pense avoir affaire à une action d'anticorps, action vitale; dans le deuxième cas, à une action purement physique ou physicochimique.

Le tableau suivant résume les résultats trouvés et montre la très légère activité antidiastasique du sang *in vivo*.

	A Sérum	B Sérum prélevé après une 1/2 h. et conservé ensuite <i>in vitro</i>	C Sérum prélevé depuis 48 heures et mélangé à de la diastase <i>in vitro</i>
Sang avant l'injection . . .	0	0	0
— 1/2 heure après . . .	2,0	2,0	2,0
— 1 heure après . . .	1,8	2,0	2,0
— 1 h. 4/2 après . . .	1,8	2,0	2,0
— 2 heures après . . .	1,4	2,0	2,0
— 2 h. 4/2 après . . .	1,1	1,8	2,0
— 24 heures après . . .	"	"	2,0

Une seconde hypothèse, plus vraisemblable, de la diminution d'activité diastasique du sang *in vivo* serait que cette diminution provient de ce que la diffusion de la diastase dans l'organisme se fait lentement. Cependant il semblerait qu'en faisant le prélèvement une demi-heure après l'injection de diastase, on ait laissé à celle-ci le temps de se répartir également dans tout le milieu liquide. Il est probable que la diastase ne diffuse dans l'organisme que très lentement. Le milieu liquide d'un animal a un poids qui égale environ 64 p. 100 de son poids total. Notre chien pesant 22 kilogrammes, le milieu liquide total égalerait 14 kilogrammes; comme nous avons injecté 130 cent. cubes de liquide diastasique, notre dilution de diastase serait d'environ 1/100, la diffusion une fois terminée. Or des comparaisons d'activité, faites une demi-heure après l'injection, entre le sang de l'animal injecté et des dilutions de diastase dans le sérum du même animal (prélevé avant l'injection), nous ont montré que la dilution de la diastase dans l'organisme était égale environ à une dilution au 1/20 de la diastase dans le sérum. La théorie voulant que ce chien ait environ 2.000 cent. cubes de sang en tout, le calcul nous amène à penser que notre animal, ayant reçu 130 cent. cubes de diastase, a dans ses veines une dilution de la diastase au 1/15 environ. Chiffre beaucoup plus raisonnable et qui se rapproche de la dilution trouvée expérimentalement comme égale au 1/20; chiffre, par contre, qui n'est nullement comparable à ceux obtenus quand on calcule par rapport au milieu liquide total du chien, ce qui donne une dilution de l'ordre de 1/100. Il semble donc logique de conclure

que la diastase, mêlée immédiatement et intimement à la masse sanguine, diffuse lentement dans l'organisme. L'action antidiastasique nulle du sang *in vitro* et (comme nous le verrons plus tard) des organes semble confirmer cette hypothèse.

b) FIXATION DE LA DIASTASE DANS LES ORGANES. — Après les injections intraveineuses, nous avons fait de nombreuses recherches pour trouver les organes qui fixaient le pouvoir diastasique de la macération injectée. Voici la technique que nous avons suivie pour faire cette recherche. Dès la mort de l'animal, les organes étaient prélevés et finement broyés. L'animal ayant été tué par saignée à blanc, les organes étaient déjà presque complètement privés de sang. On procédait à un lavage rapide pour débarrasser l'organe du plus possible de son sang. Puis, après l'avoir broyé avec du sable, on le mettait en contact (1 gramme d'organe) avec une solution d'urée à 1/100 et du toluène. Au bout de vingt-quatre heures d'étuve à 37°, on dosait l' NH_3 formé. Chaque organe avait un tube témoin pour apprécier le taux de l'acalinité de la suspension d'organe et le déduire du dosage d' N.NH_3 final. De nombreuses expériences (faites sur le rein, les muscles, le cerveau, le foie de chiens injectés de doses correspondant à 80 d'activité diastasique par kilogr. d'animal) nous ont montré que les reins, les muscles ne fixaient pas la diastase, cependant que le cerveau, et surtout le foie, fixaient une légère partie du pouvoir diastasique. Dans six expériences où les doses de diastase injectées étaient comparables, nous avons trouvé qu'un gramme de *foie* était capable de produire à 37° sur une solution d'urée en vingt-quatre heures les doses d' N.NH_3 suivantes :

1 ^{re} expérience. . .	0,009 N. NH_3	4 ^{re} expérience.	0,012
2 ^e —	0,010 N. NH_3	5 ^e —	0,016
3 ^e —	0,009 N. NH_3	6 ^e —	0,016

Dans deux expériences, le *cerveau* nous a donné un résultat positif très léger :

1 ^{re} expérience.	0,0009 N. NH_3
2 ^e —	0,0009 N. NH_3

Nous avons ensuite recherché le passage de la diastase dans l'*urine* et dans la *bile*, et nous avons trouvé une activité diastasique complètement nulle.

Nous avons ensuite procédé à des *injections sous-épidermiques massives* et, après la mort, nous avons recherché la diastase dans les organes et le sang. Comme nous le reverrons plus loin, le mécanisme d'intoxication est tout à fait différent et, en particulier, beaucoup plus lent à se développer. Nous citerons, parmi de très nombreuses recherches, deux expériences qui donnent des chiffres que l'on peut considérer comme moyens. Quarante-huit heures après l'injection, cinq à six heures après la mort, on trouve le *sang légèrement actif*. 1 cent. cube de sérum produit 0,001 d'N.NII³ en vingt-quatre heures à l'étuve. Dans une deuxième expérience, 1 cent. cube de sérum produit 0,0012 d'N.NII³. Il n'a pas été possible de déceler le moindre pouvoir diastasique dans les organes, pas plus dans les urines que dans la bile.

Les *administrations de diastase par la bouche* ne nous ont donné aucun *passage de diastase* dans l'organisme, qu'il s'agisse du sang ou des organes.

IV. — Action toxique de l'uréase *in vivo*.

L'action toxique a été particulièrement étudiée par nous en un grand nombre d'expériences que nous résumerons brièvement, renvoyant aux notes que nous avons communiquées à la Société de Biologie (1) et à l'Académie des Sciences (2).

Nous avons produit l'intoxication sous trois formes : 1^o l'*intoxication aiguë*; 2^o l'*intoxication subaiguë*; 3^o l'*intoxication chronique*, en procédant soit à des injections intraveineuses massives, soit à des injections sous-épidermiques massives, soit à des injections intraveineuses ou sous-épidermiques subintensives.

1^o **INTOXICATION AIGUE.** — *Disparition totale d'urée, production d'ammoniaque.* — Lorsque l'on injecte dans la veine d'un animal une macération de farine de soja à 10 p. 100 à doses suffisantes, on obtient avec une rapidité extraordinaire la *transformation totale de l'urée de son organisme en ammoniaque*. L'urée étant extrêmement diffusible, il est certain que, s'il en restait la

(1) *C. R. Soc. de Biol.*, 12 avril 1919.

(2) *C. R. Acad. des Sciences*, 15 juillet 1910.

moindre trace dans l'organisme, la présence de l'urée serait décelable dans le sang. Or, cinq minutes après une injection de 60 cent. cubes de diastase d'activité 42 à un chien de 10 kilogrammes environ, le xanthydrol ne peut précipiter la moindre trace d'urée à l'état de xanthylurée dans le sang prélevé à ce chien. Il est bien entendu que toutes les précautions ont été prises pour éviter que l'action de la diastase injectée ne se continue sur l'urée sanguine, *in vitro*, après la prise. Le sang est recueilli directement dans le réactif iodomercurique au sortir de la veine et l'on connaît l'extrême sensibilité du dosage de l'urée par le xanthydrol et son extrême précision. Cette disparition totale de l'urée se maintient pendant un temps variable selon les quantités de diastase injectées.

Lorsque la dose de diastase indiquée plus haut a été injectée, les phénomènes toxiques s'installent dès le début et l'*animal meurt, en un temps plus ou moins long, d'intoxication ammoniacale*. Parfois l'animal meurt sans que l'urée ait eu le temps de réapparaître dans le sang; d'autres fois, on assiste à un retour manifeste de l'urée dans le milieu sanguin quelque temps avant la mort. Les lésions produites par l'ammoniémie du début semblent définitives et la réapparition de l'urée ne semble pas jouer un rôle favorable quelconque dans la régression des phénomènes toxiques.

De l'ensemble de nos expériences sur l'intoxication aiguë, il semble se dégager deux faits généraux auxquels nous n'avons pas vu d'exception. Le premier est qu'il faut un certain taux minimum d'activité diastasique par kilogramme d'animal pour arriver à l'intoxication aiguë : ce taux est à peu près égal à 60 d'activité diastasique par kilogramme. Si ce taux n'a pas été atteint, l'animal, après quelques phénomènes d'excitation nerveuse, de myoclonisme, se remet et survit sans les moindres séquelles. Le deuxième fait est que l'animal, injecté d'une dose suffisante de diastase, meurt quand, dans son sang, l' N.NH_3 a atteint une concentration d'environ 0 gr. 070 par litre (que nous appellerions le *seuil d'intoxication ammoniacale*). Cette seconde règle est, d'ailleurs, générale et semble s'appliquer à toutes les intoxications, qu'elles soient aiguës, subaiguës ou chroniques. Nous avons toujours trouvé, dans le sang des animaux morts par injection d'uréase (qu'elles aient été mas-

sives ou subintrantes, intraveineuses ou sous-épidermiques), des doses d' $N\cdot NH_3$ au moins égales à 0,070 par litre.

Cette constatation semblerait bien prouver que *l'animal meurt bien d'ammoniémie et uniquement d'ammoniémie*.

En effet, lorsque l'on injecte des diastases, on ne peut jamais séparer ces dernières de leur support albuminoïde, quelles que soient les purifications que l'on essaie de faire; aussi craint-on toujours de n'avoir observé que la résultante de plusieurs actions : actions diastasiques pures et action toxique des supports albuminoïdes. Cette dernière a été souvent mise en évidence, et nombreuses sont les diastases dont le pouvoir diastasique pur est inoffensif cependant que l'animal succombe à chaque injection de la diastase accompagnée de son support. Dans le cas de l'uréase, la régularité avec laquelle on voit l'animal atteindre son seuil ammoniélique avant de mourir tend à faire croire que, seules, les propriétés urolytiques entrent en jeu dans le mécanisme de l'intoxication.

Pour ajouter à ces faits de nouvelles preuves, nous avons essayé de détruire la diastase en touchant le moins possible au support de cette dernière. Malheureusement nous nous sommes heurtés à des difficultés très grandes que nous avons décrites dans un des paragraphes précédents. Les antiseptiques, l'addition d'alcalis ou d'acides précipitaient les albumines du liquide avant de neutraliser d'une façon appréciable le pouvoir diastasique. Seule la chaleur nous a donné un bon résultat, car nous avons pu, par ce moyen, détruire complètement le pouvoir diastasique sans produire de précipitation dans le liquide.

Intoxication suraiguë, après surcharge préalable en urée de l'organisme. — Une autre série d'expériences consiste à activer l'action toxique de l'uréase en donnant à celle-ci une plus grande quantité d'urée à transformer en carbonate d'ammoniaque : elle démontre d'une façon nette le mécanisme de l'intoxication.

Nous avons dit que, lorsque l'on n'injecte pas à l'animal la dose de diastase suffisante, celui-ci ne meurt pas, bien que, dans certains cas, les réactifs démontrent la disparition totale ou presque totale de l'urée du sang. Or ces animaux étaient toujours peu chargés en urée et avaient, avant l'expérience, des doses variant de 0,04 à 0,06 d' N uréique dans le sang.

Après transformation intégrale de l'urée en NH_3 par la diastase injectée, ils n'ont toujours que 0,04 à 0,06 d' NH_3 dans le sang, ce qui n'est pas suffisant pour amener la mort.

Un fait curieux est cependant à remarquer : lorsqu'on introduit dans l'organisme de l' NH_3 sous forme de sesquicarbonate d'ammoniaque à un taux de 0,04 par kilogramme environ, on constate des contractures et des phénomènes d'intoxication très nets, alors que le sang ne renferme que des quantités d' NH_3 égales à environ 0,03 par litre de sang. Par injection d'uréase on peut amener ce taux à 0,04 et même 0,06 sans constater le moindre phénomène de contracture ou d'intoxication. L' NH_3 produit de cette façon paraît plus supportable à l'organisme et, le seuil mortel d' NH_3 n'ayant pas été atteint, l'animal survit.

Mais si l'on charge l'animal en urée par un moyen quelconque (le plus simple est de lui faire des injections d'urée) et que l'on fasse agir des quantités de diastase, même moins fortes que les quantités indiquées comme non mortelles, on arrive à faire mourir l'animal dans un temps très court.

Nous avons procédé de deux façons à cette expérience. A un premier chien nous avons d'abord injecté 75 de pouvoir diastasique par kilogramme. Cette dose devait être mortelle en deux heures environ. Le chien avant l'injection avait un sang qui contenait seulement 0,10 d'urée. Dès l'injection de diastase, nous poussons dans ses veines une solution concentrée d'urée au 1/5, puis, dix minutes et dix-sept minutes après, nous recommençons une injection d'urée. L'animal meurt au bout de vingt minutes ayant un taux formidable d'ammoniaque dans son sang.

Dans la seconde expérience, nous avions chargé le chien en urée, en lui faisant deux injections sous-cutanées de 10 grammes d'urée faites les jours précédents, et une troisième injection de 10 grammes faite le jour même deux heures avant l'injection de diastase. Au moment de l'injection, l'animal a un sang contenant 0,442 d'urée. On lui injecte seulement 30 de pouvoir diastasique par kilogramme (quantité tout à fait insuffisante pour amener la mort). Néanmoins le chien meurt en quinze minutes sans phénomènes de contractures, ne montrant aucun des signes de la première phase de l'intoxication aiguë, pour ne

manifester que les derniers symptômes qui précèdent la mort : apnée et coma. Le sang prélevé cinq minutes après l'injection contenait déjà 0,16 d'N.NH³ par litre. Là encore nous voyons la seule ammoniémie jouer un rôle important, et, selon que par des artifices, nous arrivons à diminuer ou à augmenter le taux d'N.NH³ produit dans le sang, nous diminuons ou augmentons la toxicité de la diastase.

Nous résumons dans les tableaux suivants ces deux expériences qui démontrent nettement que la mort est bien fonction de la rapidité avec laquelle le taux de l'N.NH³ s'élève dans l'organisme.

1^{re} EXPÉRIENCE. — Injection d'urée de suite après l'injection d'uréase.

PRÉLÈVEMENT DE SANG	INJECTIONS D'URÉE à 10 0/0	DOSAGES DANS LE SANG	
		N urée p. litre	N.NH ³ p. litre
Avant l'injection de l'uréase.	»	0,106	0,005
1 minute après l'injection	1 c. c.	0,02	"
5 minutes —	2 c. c.	0,421	0,100
17 minutes —	3 c. c.	1,59	0,23

2^e EXPÉRIENCE. — Charge du chien en urée avant l'injection.

PRÉLÈVEMENT DE SANG		DOSAGES DANS LE SANG	
		N urée p. litre	N.NH ³ p. litre
Avant l'injection		0,442	0,0056
5 minutes après l'injection		0,354	0,161
15 minutes —		0,274	0,226

Les accidents tiennent-ils à la disparition de l'urée ? — Les deux expériences précédentes sont à double fin : car elles résolvent un autre problème : *L'urée a-t-elle un rôle physiologique ?* La concordance des deux actions, production d'N.NH³ et disparition totale de l'urée, ne marque-t-elle pas le rôle de ce dernier, ou bien le groupement de ces deux phénomènes

ne vient-il pas créer un nouveau genre d'intoxication où l'ammoniémie n'interviendrait pas seule. En un mot, une cellule privée d'urée peut-elle continuer à vivre? Les deux expériences que nous avons relatées répondent directement à cette question. Car, comme les chiens recevaient continuellement de l'urée, à aucun moment de l'expérience l'absence totale de l'urée ne s'est manifestée. Il y a toujours eu un taux d'urée maintenu constant ou à peu près. Néanmoins les animaux sont morts avec la même rapidité et avec le même syndrome d'intoxication. Inversement nous avons eu des animaux à faible taux d'urée sanguine initiale, dont toute l'urée est disparue après l'injection d'uréase et qui n'ont manifesté aucun accident. L'urée ne semble donc pas jouer un rôle indispensable dans l'organisme et son absence ne semble pas être cause de l'intoxication par l'uréase.

Le rôle diastasique ayant été précisé dans le mécanisme de la mort par injection d'uréase, il nous reste à décrire, avec quelques détails, l'intoxication aiguë type sur un animal normal.

Un chien de 8 kilogr. 900 reçoit en cinq minutes dans la veine fémorale 60 cent. cubes d'une macération de soja à 10 p. 100 représentant 100 d'activité diastasique par kilogramme d'animal. Le chien vomit d'ordinaire vers le milieu de l'injection; puis les premières contractions apparaissent vingt minutes après la fin de l'injection qui a duré dix minutes; de grandes crises tétaniformes, avec contraction du diaphragme et opisthotonus, des contractures spasmodiques des membres en extension se produisent de cinq en cinq minutes, cependant que des périodes de coma s'intercalent entre les crises. Une heure trois quarts après l'injection, l'animal meurt ayant une température anale de 43°5, qui persiste une demi-heure après la mort. A l'autopsie on trouve un cœur en systole, un sang noir incoagulé, des organes congestionnés (notamment le cerveau ponctué de petites taches hémorragiques). Le sang analysé avant l'injection contenait 0,039 d'N uréique par litre (méthode de Fosse) et seulement 0 milligr. 7 de N.NH₃, une deuxième prise de sang, faite vingt minutes après la fin de l'injection, montre une disparition totale de l'urée du sang; le taux de l'N.NH₃ est monté à 0,057 par litre. On retrouve donc intégralement, sous

forme NH_3 , tout l' N uréique disparu. Quarante minutes après nous trouvons le même résultat.

Une quatrième prise de sang, faite une heure trois quarts après l'injection, au moment de la mort, donne un taux de N.NH_3 égal à 0,0753 par litre, cependant qu'on ne peut déceler la moindre trace d'urée au xanthydrol.

Pour nos dosages, nous prenons toujours la précaution de recueillir directement le sang dans l'éprouvette contenant le réactif iodomercurique, car on sait l'extrême rapidité de l'action de l'uréase ; aussi l'abandon du sang recueilli, pendant quelques minutes, *in vitro* sans que la diastase soit détruite fausserait-il complètement les chiffres. Il en est de même pour les organes que nous avons analysés au point de vue de leur teneur en ammoniaque. Ici, la difficulté est encore plus grande : car, avec quelque rapidité que l'on aille, il faut le temps matériel de prélever l'organe après la mort de l'animal, de découper immédiatement quelques lanières de l'organe, de les hâcher et de les précipiter dans l'alcool méthylique qui arrête toute action diastasique.

On peut prendre comme chiffres normaux de teneur en N.NH_3 les chiffres suivants : pour le foie, 0,069 p. 1.000, pour le cerveau 0,058 p. 1.000. Les analyses des organes du chien, mort après l'injection d'uréase, sont très chargées en NH_3 ; on trouve en effet pour le foie 0,161 par kilogramme, et pour le cerveau 0,204 par kilogramme.

Les nombreuses injections intraveineuses que nous avons faites au chien en respectant ces proportions nous ont toujours donné des intoxications du même type, la mort survenant dans des temps très comparables les uns aux autres. Au point de vue chimique, très souvent, nous avons assisté à des réapparitions plus ou moins tardives de l'urée après qu'elle avait complètement disparu du sang.

La disparition totale de l'urée peut se faire très rapidement : cinq minutes et même une minute après la fin d'une injection (qui pouvait durer elle-même quatre ou cinq minutes) on avait parfois une disparition presque totale de l'urée : De 0,10 l' N uréique est tombé à 0,02 en une minute dans une de nos expériences.

Mécanisme de la réapparition de l'urée. — La réapparition de

l'urée semble être fonction d'un mécanisme opposé à celui de l'urolyse et due à un mécanisme de synthèse physiologique (action uropoïétique du foie), qui lutte contre l'NH³ introduit en fabriquant de l'urée à ses dépens. Ce mécanisme de défense antitoxique est long à se manifester. La diffusion de la diastase, introduite dans le sérum sanguin, se fait lentement dans les autres sérosités du corps humain (tout au moins au début). Le sang reste donc longtemps chargé d'uréase, donc fortement urolytique, ce qui masque l'action réversive du foie. Au bout d'un certain temps seulement, quand le taux diastasique du sang s'est abaissé et ne peut plus détruire l'urée fabriquée par le foie, alors nous voyons l'urée réapparaître, d'abord à l'état de traces, pour retrouver un taux normal dans un temps assez court.

Pour synthétiser toutes ces données, nous allons réunir en tableau trois types d'intoxication aiguë mortelle par l'uréase. Ces trois types se différencient uniquement par la rapidité de réapparition de l'urée dans le milieu sanguin privé momentanément de ce corps par l'action urolytique de la diastase injectée.

	A		B		C	
	N urée	N.NH ³	N urée	N.NH ³	N urée	N.NH ³
Avant l'injection . . .	0,590	0,0007	0,0442	0,011	0,412	0,037
5 min. après l'inject.	"	"	0,0010	"	0,002	"
30 min.	—	0,0000	0,0576	0,0596	0,000	0,1130
1 heure	—	0,0000	0,0340	"	0,013	"
1 h. 1/2	—	"	"	"	0,015	0,157 Mort.
2 heures	—	0,0000	0,0753	0,0000	"	"
			Mort.	"		
2 h. 1/2	—	"	"	traces in- dosables	"	"
3 heures	—	"	"	traces in- dosables	0,050	"
					Mort.	"

Comme on le voit d'après ces trois types d'intoxication aiguë, A, B et C, la mort s'est produite plus ou moins rapidement selon le taux d'NH³ produit, ce taux étant lui-même fonction du taux de départ de la concentration uréique du sang. La réapparition de l'urée dans le sang s'est faite au bout de temps

très inégaux sans influencer le moins du monde l'action toxique de l'uréase.

Charge des organes en ammoniaque. — Nous avons étudié, concurremment, la production d' $N.NH^3$ dans les organes ainsi que la disparition de l'urée. De ce côté, nos études ont été moins poussées que sur le sang : car il y a une très grande difficulté à analyser les organes dès la mort du chien, sans que cette analyse soit entachée d'erreur grossière. En effet, la diastase peut continuer à agir *post mortem*, et en dehors de cette action. Gay Andersen (1) a constaté la rapidité extrême avec laquelle l'urée d'un organe pouvait se transformer en ammoniaque dès la mort de cet organe. Cet auteur en est arrivé à cette conclusion : si l'organe est placé dans des conditions telles que tout mécanisme biochimique de transformation d'urée en NH^3 ne puisse se faire, le taux d' NH^3 , comparé à celui de l'urée dans les organes, est identique à celui du sang. L'auteur indique en même temps ces conditions qui consistent à placer les organes dans de l'alcool à — 20° dès la mort de l'animal. Sans avoir réalisé ces conditions, nous avons opéré de façon à arrêter aussi rapidement que possible toutes les actions diastasiques, et pour ce faire, nous prélevions aussi rapidement que possible après la mort un fragment de l'organe à analyser que l'on hachait et que l'on plaçait immédiatement dans une capsule contenant de l'alcool méthylique sulfurique ($5CH^3OH + 0,25 SO_4H^2 1/10N$) pour 4 grammes organe frais. Nous avons pris comme témoins les chiffres que nous avons obtenus en opérant de la sorte sur des organes normaux. Nos chiffres, sans avoir une rigueur absolue, pouvaient se comparer entre eux. Faute d'avoir opéré de la sorte, les auteurs donnent dans les livres classiques des chiffres moyens de teneur en NH^3 beaucoup trop forts.

Nous n'avons étudié l'urée de façon systématique que dans le foie après l'injection intravéineuse mortelle d'uréase, le foie est complètement privé de son urée au moment de la mort, c'est-à-dire environ deux heures après l'injection. Nous avons obtenu trois fois ce résultat dans trois expériences différentes. L'organisme est aussi très surchargé en ammoniaque, et on verra, dans le tableau suivant, que les teneurs en $N.NH^3$ sont

(1) *Biol. ch. Journ.*, 34, p. 269.

parfois triplées. Nous ne donnons évidemment pas d'une façon exacte la teneur des tissus en N.NH₃ : car, quoique l'animal soit saigné à blanc au moment de la mort, les glandes vasculaires, comme le foie, le rein, retiennent toujours une certaine quantité de sang qui vient fausser les dosages. Nos chiffres expriment donc l'ensemble de l'NH₃ et de l'urée contenus dans les tissus et dans le sang restant qui imprègne les tissus. Dans le tableau suivant nous avons groupé les chiffres normaux trouvés par nous et les chiffres d'N.NH₃ trouvés dans les organes après injection d'uréase au cours de trois expériences.

	N.NH ₃ p. 1.000 normal	APRÈS INJECTION		
		Expér. A	Expér. B	Expér. C
Cerveau	0,058	0,126	0,130	0,097
Foie	0,069	0,255	0,340	0,342
Muscle	»	0,098	»	0,143
Poumon	»	0,199	0,290	»
Rein	0,042	»	»	0,380

L'intoxication ammoniacale produite par l'uréase est comparable à l'intoxication produite par l'injection intraveineuse de sels ammoniacaux à acide faible. — Comme il est facile de le voir dans les tableaux précédents, les augmentations sont très nettes. L'ammoniémie est accompagnée de fixation d'NH₃ dans les tissus. Si nous prenons le taux moyen d'N.NH₃ normal en prenant les quantités d'N.NH₃ trouvées dans le sang normal et les tissus normaux, nous arrivons au chiffre de 0,042 par kilogramme d'animal. Si nous faisons le même calcul après l'injection d'uréase, nous trouvons 0,16. Il y a donc une augmentation de 0,118 d'N.NH₃ par kilogramme. Si nous ne considérons que l'augmentation d'N.NH₃ dans le sang, nous le trouvons variable entre 0,07 et 0,250 selon la charge d'urée de l'animal avant l'injection. Tous ces chiffres sont égaux ou supérieurs aux doses mortelles d'N.NH₃ indiquées dans les livres classiques (1). En effet, sous forme de sesquicarbonate, l'injection de 0,07 d'N.NH₃ par kilogramme d'animal suffit à

(1) Dictionnaire Richet, article Ammoniaque.

déterminer la mort. Nous avons donc réalisé, par injection d'uréase, une intoxication ammoniacale comparable à celle produite par l'injection de sels ammoniacaux.

Nous avons répété de nombreuses fois des expériences d'intoxication ammoniacale par voie intraveineuse, en nous servant du sesquicarbonate d'ammoniaque. Ce sel ammoniacal se trouve facilement dans le commerce et se rapproche du carbonate d'ammoniaque qui est la résultante de l'action de l'uréase sur l'urée. Dans des travaux inédits que nous publierons plus tard, nous avons étudié en détail le mécanisme de ces intoxications, ainsi que le mécanisme de réaction de l'animal contre l'envenissement par les sels ammoniacaux. Nos seuils de toxicité ont été toujours dans les limites indiquées par les livres classiques, correspondant aux limites trouvées dans nos expériences avec l'uréase. Néanmoins, pour comparer d'une façon raisonnable ces chiffres, il faut faire une réserve. Quand on donne 0,07 d'N.NH³ comme limite de toxicité par kilogramme d'animal, on fait entrer dans ce calcul tout le corps de l'animal comme si les différents tissus jouaient un rôle égal. Or, il serait plus conforme à la vérité de ne considérer dans ces calculs que le milieu liquide comme poids intéressant. Il est égal à environ 64 p. 100 du poids total. Si la dose toxique est 0,07 d'N.NH³ par kilogramme d'animal, cela fait, en réalité, 0,11 par kilogramme en ne faisant intervenir que le milieu liquide. C'est à ce chiffre qu'il faut comparer nos résultats : car notre taux ammoniacal est calculé d'après des dosages faits dans le sang et des organes très vascularisés comprenant 90 p. 100 d'eau. Nous les trouvons, d'ailleurs, très près l'un de l'autre : 0,118 pour l'uréase, 0,110 pour l'injection de sesquicarbonate.

2^o INTOXICATION SUBAIGUE. — Nous sommes arrivés à réaliser un type d'intoxication subaiguë par l'action de l'uréase en injection sous-épidermique. Sa diffusion dans l'organisme est beaucoup plus lente et l'ammoniémie progresse beaucoup plus lentement. Comme dans les cas d'intoxication aiguë, nous avons constaté qu'il fallait injecter un minimum de pouvoir diastasique par kilogramme d'animal pour produire dans son organisme un taux ammoniacal suffisant à déterminer la mort.

Ce minimum est sensiblement égal à celui qu'il faut injecter

pour produire l'intoxication aiguë. Des chiens de 10 kilogrammes recevant environ 70 de pouvoir diastasique par kilogramme, meurent régulièrement en trente-six et quarante-huit heures. Au moment de la mort on trouve dans le sang un taux d' N.NH_3 de 0,07 pour 100 correspondant au seuil de toxicité, et les organes sont chargés en ammoniaque dans des proportions comparables à celles que nous trouvons après les injections intraveineuses.

Toutes ces intoxications ont le même type physiologique, qui se résume ainsi : L'animal injecté perd rapidement sa vivacité et demeure taciturne pendant vingt-quatre heures environ. Il ne mange presque plus, puis brusquement, vers la trentième heure, il se couche dans sa cage, et tombe dans un état comateux qui s'aggrave rapidement. A aucun moment, on ne saisit chez lui la moindre contracture. Vers la quarante-cinquième heure, il meurt sans bouger, en état d'anurie et de coma complets.

La diffusion de la diastase dans l'organisme est plus lente; mais l'effet global est identique : car, *au moment de la mort, le taux ammoniéique est atteint.*

Nous avons recherché la rapidité de diffusion de la diastase dans l'organisme et nous ne sommes arrivés à déceler un pouvoir urolytique dans le sang qu'au moment même de la mort. Le taux ammoniacal du sang s'élève bien avant que ce pouvoir urolytique apparût dans le sang. Il est, d'ailleurs, facile d'expliquer ce phénomène. Au niveau de l'injection, la diastase fabrique de l'ammoniaque aux dépens de l'urée qui se trouve dans les tissus en contact; cet ammoniaque, emporté par le courant sanguin, est sans cesse remplacé par un apport nouveau d'urée qui subit la transformation ammoniacale à ce niveau. La diastase, ne diffusant que très lentement à travers les vaisseaux, ne passe pas encore dans le sang, alors que l'échange de corps aussi diffusibles que l'urée et l' NH_3 se fait très facilement.

Dans deux expériences, suivies avec grande attention, nous ne sommes arrivés à déceler qu'un pouvoir diastasique très faible, égal à environ 3 au deuxième jour (c'est-à-dire que 1 cent. cube de sérum sanguin a produit, en vingt-quatre heures à 37°, sur 5 cent. cubes d'urée à 1 p. 100, 0 gr. 003 d' N.NH_3). Comme la diastase n'inonde pas l'organisme ainsi que dans le procédé des injections intraveineuses, l'action uropoïétique du foie peut se manifester et l'on assiste, après l'injection d'uréase,

à une augmentation d'urée dans le sang. Nous ne pouvons, d'ailleurs, donner une explication chimique à cette augmentation : car, en définitive, la dose de N total de l'organisme ne se modifie pas. Et nous n'assistons qu'à une transformation de l'urée en NH_3 par la diastase, puis à une transformation de l' NH_3 en urée par le foie.

Cependant, dans l'intoxication subaiguë comme dans l'intoxication aiguë, nous assistons à un *blockage du rein*, qui peut expliquer cette surcharge de l'organisme en urée. Dans une expérience, nous voyons le taux moyen d'élimination d'eau, qui était de 731 cent. cubes par vingt-quatre heures, tomber à 243 cent. cubes après l'injection d'uréase. Les quantités d'N uréique et d'N ammoniacal qui étaient respectivement de 0,236 et de 3 gr. 70 par vingt-quatre heures, deviennent après l'injection 0,177 pour l'N. NH_3 et 2,85 pour l'N uréique. Le rapport $\frac{\text{N NH}_3}{\text{N urée}}$, qui était de 0,062 avant l'injection, est exactement de 0,062 pendant les deux jours qui suivent l'injection. Dans une seconde expérience où nous avions suivi l'élimination de l' NH_3 et de l'urée, le rapport augmente dans de très faibles proportions. Il était de 0,13 avant, et, après, il est de 0,15. Malgré cette surcharge du sang en N. NH_3 , nous ne voyons pas la composition urinaire changer de façon appréciable et les quantités d'N. NH_3 éliminées, par rapport aux quantités d'N uréique, restent les mêmes. On pourra suivre dans le tableau ci-dessous la marche de l'intoxication chez un chien de 10 kilogrammes ayant reçu 67 de pouvoir diastasique par kilogramme.

	SANG N urée p. 1.000	SANG N. NH_3 p. 1.000
Avant l'injection	0,088	0,0005
2 heures après l'injection	0,121	0,00013
24 heures —	0,084	0,00047
42 h. après l'injection au moment de la mort.	0,255	0,074

Les dosages de N. NH_3 faits dans les organes nous montrent, comme dans les cas d'intoxication aiguë, une augmentation d'N. NH_3 dans les tissus. Toujours, contrairement à ce qui se passe dans l'intoxication aiguë, on retrouve dans les organes

comme dans le sang un taux d'urée légèrement augmenté. Nous avons réuni dans un tableau les quelques chiffres que nous avait donnés l'expérience :

	A		B	
	N.NH ³ p. 1.000	N urée	N.NH ³ p. 1.000	N urée
Foie	0,312	0,219	0,150	0,215
Cerveau	»	»	0,426	»
Muscles	0,105	»	0,084	»
Poumon	»	»	0,429	»

Si nous procérons au même calcul que pour l'intoxication aiguë, nous trouvons qu'ici l'organisme est encore un peu plus chargé en N.NH³. Celui-ci atteint 0,17 par kilogramme.

3^e INTOXICATION CHRONIQUE. — Nous avons cherché à réaliser l'intoxication chronique par injections sous-épidermiques et par injections intraveineuses. Les phénomènes d'intoxication sont, d'ailleurs, tout à fait différents et ne ressemblent nullement à des phénomènes d'intoxication subaiguë ralenti. L'action réversive du foie n'est diminuée à aucun moment et jamais l'on n'assiste à une forte baisse du taux uréique dans le sang. On a une élimination très forte d'NH³ par l'urine. L'animal résiste fort bien à l'administration quotidienne des petites doses d'uréase, et, comme nous le verrons dans une des expériences que nous allons détailler, il faut arriver à l'injection d'assez fortes doses, égales à près de la moitié de la dose mortelle, pour arriver à des manifestations nettes d'intoxication.

a) *Injections sous-épidermiques.* — Nous citerons d'abord les expériences où nous avons injecté de très petites doses d'uréase sous l'épiderme. Au cours d'une première expérience, nous nous sommes préoccupés uniquement de suivre l'élimination de l'N. sous sa forme uréique et sous sa forme ammoniacale. Tout le protocole d'expérience est réuni en un tableau où sont inscrits les quantités de diastase injectées, et l'émission journalière d'urine et de N. sous ses différentes formes. Ce n'est qu'après

la sixième injection que commence à se faire sentir la rétention d'urine et qu'apparaissent les hématuries; par contre l'émission de l'urée par vingt-quatre heures baisse sensiblement à la sixième injection, cependant que le taux de l' NH_3 baisse aussi, il est vrai, mais d'une moins grande quantité. Cette constatation nous a amenés à considérer le rapport du taux de l' N de l'urée au taux de l' N.NH_3 pour juger d'une façon précise et nette le changement amené par l'injection d'uréase dans l'élimination de ces deux corps. Bien plus que les chiffres absolus d' N de l'urée et d' N de l' N.NH_3 , ce rapport montre, par son abaissement au moment des injections de diastase, le surplus d' N.NH_3 produit par rapport à l'urée. La fin des injections permet, d'ailleurs, à ce rapport de revenir à une moyenne normale, correspondante à ce qu'il était avant le traitement par l'uréase :

DATES	DIASTASE injectée	URINE			RAPPORT $\frac{\text{N urée}}{\text{N.NH}_3}$	MOYENNES
		Emission	N urée 24 h.	N.NH ₃ 24 h.		
12	—	1.300	5,20	0,20	26,04	26
13	2 c. c.					
14	2 —					
15	4 —	1.375	6,77	0,37	18,3	
16	"	"	"	"	"	
17	4 c. c.	1.391	5,89	0,34	17,0	
18	4 —	1.425	5,20	0,20	17,5	17,6
19	8 —	1.335	3,9	0,30	15,8	
20	8 —	455	2,7	0,45	17,8	
21	"	455	2,7	0,45	17,8	
22	"	1.390	3,4	0,45	26,7	
23	"	1.210	5,4	0,49	27,2	
24	"	1.680	5,15	0,25	20,3	20
25	"	1.085	4,76	0,30	15,3	
30	"	1.325	5,25	0,24	25,0	
2	"	1.880	5,88	0,30	19,28	

L'animal a continué à bien se porter pendant l'expérience : la seule manifestation toxique a été une hématurie après la cinquième injection, hématurie qui n'a d'ailleurs duré que deux jours et a cédé dès que la diastase fut supprimée.

Dans notre deuxième expérience nous avons utilisé des doses plus fortes mais plus espacées, et cette fois nous avons suivi le

métabolisme de l'N non seulement dans son urine, mais aussi dans son sang. L'examen de ce second tableau permet, cette fois, de mieux suivre l'action diastasique. L'émission n'est diminuée que lorsque l'on arrive aux doses de 15 cent. cubes et encore à la troisième injection. Néanmoins ces doses sont bien supportées : car on voit l'émission se relever le second jour après l'injection. Il faut arriver à l'injection de 40 cent. cubes pour voir se manifester une intoxication nette, avec baisse progressive de l'émission et, finalement, mort du chien en une dizaine de

DATES	URINE			RAPPORT N urée N.NH ³	SANG		
	Emission	N urée 24 h.	N.NH ³ 24 h.		N total p. 1.000	N urée p. 1.000	N.NH ³ p. 1.000
15	790	5,55	0,263	21	0,435	0,088	0,0001
16	900	6,10	0,277	22			
Injection 10 c.c. diastase.							
17	1.000	6,23	0,335	18	0,097	0,04	0,0004
Injection 10 c.c. diastase.							
18	960	4,72	0,45	10	0,425	0,074	0,0001
19	590	3,00	0,26	11			
Injection 15 c.c. diastase.							
20	320	4,36	0,31	14 albumine			
21	405	4,56	0,15	10	0,439	0,446	0,0001
21	405	4,56	0,15	10			
22	Injection 15 c.c. diastase.				0,439	0,114	0,00003
23							
24	760	3,43	0,46	11	0,411	0,074	0,00002
25	940	5,9	0,27	21			
Injection 15 c.c. diastase.							
26	340	1,98	0,19	10			
27	950	4,17	0,33	12			
28	480	4,39	0,23	19			
28	480	4,30	0,23	19			
Injection 40 c.c. diastase.							
30	390	5,7	0,42	13			
31	470	4,4	0,34	12			
1	280	4,32	0,26	16	0,431	0,123	0,004
2	223	4,8	0,30	16			

jours. Malheureusement le sang de cet animal n'a pu être analysé le dernier jour. Les variations d'élimination de l'N de l'urée par l'urine sont légèrement déconcertantes et contradictoires.

L'NH₃ a une élimination plus compréhensible : régulièrement, vingt-quatre heures après l'injection, on voit le taux ammoniacal augmenter dans l'urine ; cette élévation est de courte durée.

C'est encore dans ce cas le rapport $\frac{\text{N. urée}}{\text{N.NH}_3}$ qui exprime de la façon la plus limpide les phénomènes chimiques qui se passent ; on le voit régulièrement s'abaisser après chaque injection pour se relever très rapidement quelquefois. L'N total du sang reste fixé de façon remarquable, cependant que l'N de l'urée du sang, qui a faibli de façon nette après la première injection, semble se maintenir à son taux normal de façon générale.

Il est à remarquer, néanmoins, que les résultats sont bien différents selon le moment où l'analyse est faite après l'injection. On voit, en effet, que, lorsque l'on agit avec des doses de diastase subintrantes et sous l'épiderme, on note toujours une diminution de l'urée lorsque l'on analyse le sang environ vingt-quatre heures après l'injection. Si l'on analyse, comme nous l'avons fait le 22 avril, le sang tout de suite après l'injection sous-épidermique, il n'y a pas d'action sur l'urée. Si, par contre, on attend quarante-huit heures, le sang a déjà repris un taux d'urée normal et quelquefois même supérieur à la normale. Nous n'arrivons pas, malgré 5 injections qui font en tout 65 cent. cubes de diastase, à faire apparaître l'NH₃ de façon nette dans le sang : il faut atteindre 40 cent. cubes de diastase en une seule injection pour avoir 0.004 d'N.NH₃ par litre de sang au bout de 48 heures. Cette dernière dose de diastase déclencha la mort, très lente à se produire d'ailleurs.

En résumé, le chien supporte bien les petites doses d'uréase en injection sous-épidermique et, à moins d'atteindre de fortes doses, il ne paraît pas possible de produire une élévation importante du taux ammoniématique.

b) *Injections intraveineuses.* — Pour cette partie, la question fut beaucoup moins poussée. Néanmoins nous avons injecté quotidiennement à un chien des doses croissantes d'uréase : d'abord 5 cent. cubes, puis 10 cent. cubes, puis 17 cent. cubes ; puis nous avons attendu deux jours et avons réinjecté 13 cent. cubes. Le chien les supporta bien et grossit rapidement sans donner le moindre signe d'inquiétude. L'élimination urinaire

nous a donné un rapport $\frac{\text{N. urée}}{\text{N.NH}_3}$ très faible, égal à 10. Nous attendons dix jours et le rapport est sensiblement remonté, cependant que l'on ne peut déceler la moindre trace d' NH_3 dans son sang. Il s'est produit certainement, après chaque injection de diastase, une certaine quantité d' NH_3 qui n'a nullement inquiété le chien. Ces petites quantités d' NH_3 ont été immédiatement retransformées en urée par le foie et, lorsque l'on attend seulement 24 heures pour rechercher l' NH_3 dans le sang, on ne retrouve plus que les traces normales. Ces doses subintrantes sont donc aussi bien supportées, si ce n'est mieux, qu'en injection sous-épidermique. Ceci permet d'envisager peut-être un jour le traitement de certains états pathologiques, étant donnée l'extrême facilité avec laquelle l'organisme peut résister aux injections faites à petites doses.

Pour compléter le chapitre des intoxications, nous avons voulu essayer deux autres modes d'introduction de la diastase dans l'organisme. Le premier était de l'introduire *per os*, le deuxième de faire pénétrer après trépanation quelques centimètres cubes de diastase stérile dans le cerveau.

Ces deux expériences ne nous ont donné que des résultats négatifs, ou, tout au moins pour ce qui est de l'injection intracranienne, très difficiles à interpréter.

4^e INTOXICATION *per os*. — On prend un chien de 6 kilogr. 500 : on le met en cage et en équilibre urinaire autant que faire se peut. On analyse son sang ; puis on lui administre avec une sonde 100 cent. cubes de macération deux jours de suite ; son urine est suivie et son sang analysé une deuxième fois ; on administre une seconde fois pendant deux jours 100 cent. cubes de macération et on analyse à nouveau urine et sang, quarante-huit heures après la seconde prise. Comme les résultats furent absolument négatifs, nous ne donnerons pas tous les détails de cette expérience : nous nous contenterons de la résumer. Dans le sang, l'N uréique a varié de 0,12 à 0,139 pendant toute la durée de l'expérience, tendant plutôt à augmenter ; l'N.NH₃ n'a pas augmenté. Quant à l'élimination urinaire, elle n'a varié que dans des limites physiologiques, l'urée augmentant ou diminuant de moins de 1 gramme pendant

les vingt-quatre heures, l' NH_3 ne se modifiant pas pour ainsi dire. La diurèse n'est pas influencée. La diastase n'est décelée ni dans le sang ni dans l'urine.

5^o INTOXICATION INTRACÉRÉbraLE. — Nous avons pensé pouvoir reproduire tous les phénomènes d'intoxication produits par l'injection intraveineuse d'uréase en injectant directement la diastase dans le cerveau après trépanation. Les phénomènes de contracture de tétanisation constatés proviennent à coup sûr de la fixation de l' NH_3 sur la cellule nerveuse et l'introduction de la diastase au niveau même des tissus qui paraissent le plus sensibles à l' NH_3 semblait devoir agir plus énergiquement, par conséquent plus rapidement sur l'élément nerveux ; mais, si petite que soit la quantité de liquide injecté dans un des hémisphères ou à l'intérieur d'un ventricule cérébral, il y a toujours une action traumatisante qui masque les autres phénomènes, et l'on ne sait s'il faut attribuer les contractures et les paralysies que manifeste le chien injecté à la distension du tissu cérébral, ou à l'action toxique de l' NH_3 produit par la diastase. Nous avons procédé à trois expériences calquées les unes sur les autres.

On injecte 3 c.c. 5 de diastase d'activité 9 à 12 dans l'encéphale au niveau de la ligne médiane. Cette diastase est stérilisée ; on reprend, en effet, par de l'eau stérilisée le précipité obtenu par l'action de l'alcool sur la macération. On centrifuge pour avoir un liquide clair que l'on injecte. En général dès la fin de l'injection l'animal se contracte, puis est atteint de parésie du train arrière ou des pattes de devant. D'ordinaire la paralysie est exagérée pour les membres se trouvant du côté opposé où a été fait l'injection. Dans un cas nous avons noté de l'emprostothonus, de la défécation et de la polypnée. L'animal incapable de se tenir sur ses pattes meurt ordinairement en quarante-huit heures. A l'autopsie, on trouve une substance nerveuse lésée au niveau de l'injection, avec taches hémorragiques.

Le cerveau, au niveau de l'injection, contient encore après quarante-huit heures de la diastase active. Les parties lésées analysées contiennent moins de NH_3 que d'autres parties saines du cerveau où la diastase n'a pu diffuser : les différences ne sont pas néanmoins très grandes.

	A N.NH ³	B N.NH ³
Cerveau parties saines.	0,058	0,029
— parties lésées.	0,096	0,047

Histologiquement, les lésions des cellules nerveuses sont très nettes et nous permettent de dire que nous avons réalisé localement au niveau des centres nerveux les phénomènes d'intoxication qui se produisent quand on introduit la diastase dans la circulation générale et que l'ammoniaque se fixe secondairement sur ces centres.

V. — Action réversive du foie.

Nous avons parlé dans un des chapitres précédents de l'action réversive du foie, qui n'est que la mise en œuvre de sa fonction uropoïétique. L'expérience où elle se manifeste avec le plus de limpidité est celle où l'on voit l'urée réapparaître dans le sang, au bout de une heure et demie à deux heures après la disparition totale de cette urée. Il ne semble pas douteux que cette action soit là une véritable action de défense, qui tend vraisemblablement à retransformer l'ammoniaque produit, ce qui retarderait ou éviterait les accidents. Nous avons voulu mettre en lumière cette action du foie et, pour cela, nous avons d'abord cherché à le supprimer en tant qu'organe fonctionnel en nuisant le moins possible au restant de l'organisme. Nous avons choisi deux procédés : le premier consistait à détruire le foie par ingestion ou injection de CHCl_3 ; le second consistait à faire une ligature temporaire de la veine porte au moment de l'injection d'uréase. Ces expériences nous ont donné des résultats qui, sans être tout à fait concluants, nous permettent de mettre en lumière la fonction uropoïétique du foie.

1^o Le chloroforme est administré, mélangé d'huile d'olive, par la voie buccale. Un chien de 10 kilogrammes environ reçoit d'abord 13 cent. cubes de CHCl_3 mélangé à 40 gr. d'huile, le lendemain 13 cent. cubes et le sur lendemain 13 cent. cubes encore. Ce dernier jour, la moitié des 13 cent. cubes de chloroforme

mélangés à l'huile sont injectés dans le rectum. Dès le deuxième jour l'animal fait de la cholurie et de l'albuminurie qui augmentent le troisième jour. Nous avons donc, par ce procédé, touché, en même temps, le rein et le foie; ce qui gênera dans l'interprétation des phénomènes. On injecte sous l'épiderme de ce chien une diastase dont le pouvoir est de 80 par kilogramme d'animal. Le chien, au bout de vingt-quatre heures, est déjà dans le coma et succombe au bout de trente-deux heures. Dans cette expérience les temps d'intoxication paraissent fortement réduits, la rapidité avec laquelle s'installe le coma est surtout remarquable. Car dans les expériences à injection hypodermique, où l'on n'a pas procédé à un essai de destruction du foie, l'animal ne tombe dans le coma que vers la trente-sixième ou quarantième heure pour mourir en quarante-huit heures seulement.

Nous avions espéré que, le foie étant plus ou moins détruit, l'animal fabriquerait de l' NH_3 avec son urée grâce à l'uréase, sans pouvoir retransformer son NH_3 en urée, grâce à ses ferment uropoïétiques.

Malheureusement ce que nous avions pensé ne s'est pas réalisé, bien que cependant le foie ait été très atteint, comme l'ont démontré les nombreux examens de coupes. Le protoplasma des cellules hépatiques était, en effet, très vacuolaire et ne prenait plus (ou très mal) les colorants, certaines cellules étaient même complètement vidées de leur contenu; la diffusion du CHCl_3 se faisant principalement autour de la veine sus-hépatique et non autour de l'espace porte comme on aurait pu s'y attendre.

Malgré ces grosses altérations, le taux de l'urée s'est maintenu et est même remonté comme chez les animaux à foie sain injectés de cette façon: La remontée est cependant moins forte que lorsque le foie est sain. Une seule chose semblerait montrer la déficience de l'action hépatique: nous trouvons, en effet, au dosage dans le sang et dans les organes, des taux d' N.NH_3 sensiblement plus forts que ceux trouvés dans des expériences du même genre sans destruction du foie, expériences dans lesquelles la charge en urée du sang du chien est de même force. En effet le taux ammoniacal du sang monte plus vite et atteint 0,010 pour un litre au lieu de 0,075 et les

quantités d'N.NH₃ des organes sont notablement plus élevées.

Nous réunissons ces données dans un tableau comparatif qui permet de mieux saisir les différences d'action dans les

	EXPÉRIENCE TÉMOIN		EXPÉRIENCE	
	Injection diastase sous-épidermique (7g)	par injection s.-épiderm. (7g)	N urée p. 1.000	N.NH ₃ p. 1.000
Avant l'injection : sang.	0,098	0,00005	0,096	0,001
— 24 h.	”	0,0047	”	0,020
Après l'inj. : sang { 36 h.	0,25	0,0750	0,209	0,098
— foie. . . .	”	0,150	”	0,312
— muscle . . .	”	0,084	”	0,405

deux cas. Peut-être, dans cette augmentation d'N.NH₃, peut-on voir une mise en évidence de la déficience de la fonction hépatique ?

2^o Dans une seconde expérience, nous avons voulu détruire le foie plus complètement et plus électivement. Nous avons, pour cela, injecté dans le canal cholédoque un mélange de chloroforme et de paraffine qui, pensions-nous, devait se prendre dans la glande hépatique et localiser autant que faire se peut l'action du chloroforme sur cette glande. On injecta 10 cent. cubes d'une mixture à parties égales (paraffine-chloroforme) dans le cholédoque d'un chien. On referme après cette injection et on attend au lendemain.

Le lendemain l'urine contient des traces d'albumine et des pigments biliaires. Nous avons donc encore touché le rein, mais d'après le dosage de l'albumine, il semble être beaucoup moins touché que la dernière fois. Nous faisons cette fois une injection intraveineuse de diastase, mais seulement à 42 de pouvoir diastasique par kilogramme. Cette quantité, injectée à un chien ayant une teneur en urée normale de 0,06 à 0,10 d'N uréique, ne serait pas mortelle, ou tout au moins ne le serait qu'à longue échéance. Malheureusement l'opération de la veille et l'action du chloroforme avaient réagi violemment sur l'organisme. Et notre sang de départ est un peu plus chargé en urée (0,270 N urée). La rapidité avec laquelle le chien est mort peut donc être, en partie, imputable à la grande quantité d'urée

du sang au départ, en même temps qu'à l'absence d'action du foie supprimé par l'injection de CHCl_3 . (Le foie présenté a, histologiquement, les mêmes altérations alvéolaires considérables dans le protoplasma de ses cellules. Nous avons retrouvé la même diffusion du chloroforme autour de la veine sus-hépatique, bien que l'injection de paraffine-chloroforme ait été poussée dans le cholédoque.)

Le chien meurt en dix minutes sans contractures, ayant un taux d' N.NH_3 de 0,214 p. 1.000 dans le sang; le muscle et le foie contenant respectivement 0,143 et 0,342 d' N.NH_3 par kilogramme. Ces chiffres sont comparables à ce que l'on trouve dans les cas d'injections intraveineuses, mais avec une dose de diastase plus grande (70 par kilogramme) et surtout dans un temps beaucoup moins court. Là encore, l'altération du foie semble avoir joué un rôle important dans le mécanisme de l'intoxication. L'action réversive du foie ne jouant pas, l'animal a pu atteindre un taux ammoniacal sanguin élevé en très peu de temps.

3^e Le chloroforme ayant toujours lésé le rein et le foie en même temps et ayant, de ce fait, enlevé une valeur de spécificité à nos expériences qui ne tendaient qu'à supprimer l'action hépatique, nous avons tenté de suspendre l'action hépatique seule, d'une façon temporaire, pendant l'injection et pendant dix minutes après cette injection. Nous avons pris un chien de 12 kilogr. à auquel nous avons fait, d'abord, une prise de sang; puis nous lui avons lié temporairement la veine porte en passant simplement un fil sous cette veine. Nous tendions le fil au moment où nous faisions l'injection et continuions à interrompre toute circulation porte pendant dix minutes après l'injection. A ce moment et avant de relâcher la ligature, nous avons fait une seconde prise de sang. Deux autres prises ont été faites encore après le relâchement de la ligature. La circulation porte est donc restée interrompue pendant vingt minutes: la masse intestinale s'est congestionnée et est devenue complètement noire, mais le chien supporte, sans autre symptôme, cet arrêt partiel de circulation. Nous injectons dans les veines de ce chien environ 30 unités de pouvoir diastasique par kilogramme. (Au départ, il avait un taux d' N. uréique de 0,086 p. 1.000.) Nous comparons les résultats trouvés dans cette expérience

avec ceux obtenus dans une expérience précédente comparable à presque tous les points de vue. (Nous avions injecté en effet 30 unités de pouvoir diastasique par kilogramme à un chien dont le taux de départ en N. uréique était de 0,107 p. 1.000.) Nous réunissons dans le tableau suivant les résultats trouvés :

	EXPÉRIENCE AVEC LIGATURE		EXPÉRIENCE TÉMOIN	
	N. urée	N. NH ³	N. urée	N. NH ³
Sang avant	0,086	0,0056	0,107	0,0008
— 10 minutes après ligature.	0,039	0,063	0,069	0,037
— 15 minutes après ligature enlevée	0,074	0,04	»	»
— 5 h. après.	0,112	0,016	0,083	0,014

En consultant ce tableau, nous voyons que, nous plaçant dans des conditions aussi semblables que possible, nous avons, dans le cas où nous avons interrompu la circulation du foie pendant l'injection, une diminution d'N. urée plus grande (0,047) que lorsque nous ne mettons pas de ligature (0,038). Nous avons de plus, dans le cas de la ligature, une plus grande production d'N. NH³ (0,057) au lieu de 0,036).

Dès que nous enlevons la ligature les choses tendent à se rapprocher dans les deux expériences et nous nous retrouvons à la fin de l'expérience, c'est-à-dire une heure après l'injection, avec un taux sensiblement égal d'N. NH³ dans les deux sanguins. Les doses de diastase injectées n'étant intentionnellement pas suffisantes pour occasionner la mort, nous avons pu suivre avec tranquillité les différentes phases de l'apparition et de la disparition de l'N. NH³ dans le sang. La surproduction d'N. NH³ et la disparition plus grande de l'urée correspondent bien à la suspension de l'action hépatique. Quand celle-ci rentre en jeu, l'équilibre se rétablit. Il est regrettable que nous n'ayons pas pu suspendre plus longtemps la circulation porte pour rendre encore plus sensible la différence qui s'est esquissée cependant d'une façon nette : mais les phénomènes de congestion portale extrême et d'anémie périphérique correspondants sont tels que l'expérience n'aurait plus aucune valeur si elle était prolongée ;

aussi n'avons-nous pas poussé au delà de vingt minutes la ligature de la veine porte.

Nous reprendrons, d'ailleurs, cette question avec des chiens à fistule d'Eck complète, et nous espérons, avec cette technique, démontrer d'une façon plus nette le rôle antagoniste joué par le foie dans les intoxications ammoniacales produites par l'uréase.

VI. — Anticorps et sensibilisatrice.

Au cours de nos recherches sur les intoxications chroniques, nous avons injecté de petites doses de diastases à des chiens et nous avons, de ce fait, employé le système classique pour essayer de créer des anticorps diastasiques dans le sang des animaux. La facilité des dosages, permettant d'apprécier numériquement les actions diastasiques, et donnant de ce fait à ces expériences une précision intéressante au point de vue de la biologie générale, nous pensions suivre concurremment le sang de ces animaux et au point de vue de l' NH_3 , et au point de vue des pouvoirs antidiastasiques et diastasiques. Nous espérions que cette diastase, robuste, facile à retrouver dans l'organisme, nous donnerait au point de vue antidiastasique de meilleurs effets que les innombrables diastases qui ont été essayées jusqu'à ce jour. Nous devons avouer que, malgré des préparations très longues d'animaux, nous ne sommes arrivés à aucun résultat.

Nous avons essayé la voie intraveineuse et la voie sous-épidermique.

a) VOIE SOUS-ÉPIDERMIQUE. — Notre première expérience consista en injections de très petites quantités de diastase, ces injections étant faites tous les jours. Nous avons poursuivi nos injections pendant huit jours, en commençant par 2 cent. cubes, pour donner 4 cent. cubes, puis 8 cent. cubes à la fin de la série. A ce moment se manifestaient déjà des actions urolytiques de la diastase, voire même des actions toxiques : car, après la huitième injection, des hématuries légères étaient apparues. C'est ce qui nous fit, d'ailleurs, cesser la série d'injections. Le sérum du chien fut alors examiné à deux points de vue.

D'abord au point de vue *urolytique*, nous nous aperçûmes que les injections sous-épidermiques n'avaient nullement communiqué de propriétés diastasiques au sang. En effet 1 cent. cube de sérum, mis en contact avec de l'urée pendant vingt-quatre heures à l'étuve à 37°, ne formait aucune trace d'ammoniaque. Cependant les produits d'hydratation de l'urée fabriqués par la diastase au niveau du point d'injection par simple diffusion de l'urée et de l'ammoniaque, avaient passé dans l'économie et avaient même provoqué un commencement d'intoxication. Ce peu de diffusion de la diastase dans le milieu sanguin explique d'ailleurs le manque total de réaction de l'organisme vis-à-vis de la diastase : il faut en effet, pour qu'une anti-diastase se produise, que la diastase soit mêlée intimement au milieu sanguin.

Le manque total d'*antidiastase* vint confirmer cette hypothèse. Pour rechercher l'antidiastase, nous avons mis en contact, dans une série de tubes, 0 c. c. 1 de diastase active avec des doses croissantes de sérum de 0 c. c. 1 à 1 cent. cube de sérum. Puis nous avons laissé en contact pendant vingt-quatre heures à l'étuve à 37° et nous avons ensuite essayé l'activité du mélange comparativement avec 0 c. c. 1 de diastase pure abandonnée vingt-quatre heures à l'étuve à 37°. *L'action diastasique était renforcée par la présence du sérum au lieu d'être diminuée.* Ce renforcement est, d'ailleurs, dû à une action physique que nous avons étudiée longuement dans un paragraphe précédent. *Il ne paraît donc pas y avoir d'antidiastase produite* ; au cas où celle-ci existerait, elle n'existerait que dans de faibles proportions qui seraient alors masquées par l'action de renforcement du pouvoir diastasique dû au milieu albumineux du sérum.

Il nous restait à faire une seconde épreuve pour vérifier que les injections subintrantes de diastase n'avaient produit aucune immunisation : on injecta le chien de la dose mortelle minima de pouvoir diastasique par kilogramme : la mort se produisit dans les mêmes conditions, avec le tableau habituel : même rapidité, mêmes contractures, même production d'ammoniaque dans le sang et les organes. *Il n'y avait donc ni antidiastase ni immunisation.*

Nous avons, néanmoins, recommencé une deuxième expé-

rience en injectant, tous les deux ou trois jours environ, des quantités de diastase sensiblement plus fortes. En seize jours nous avons injecté, à six reprises différentes, 105 cent. cubes de diastase en commençant par 10 cent. cubes pour finir par une dose massive de 40 cent. cubes. Le chien supporta assez bien ces doses et l'on ne vit apparaître, en laissant deux ou trois jours de repos entre chaque injection, ni hématurie, ni albumine urinaire. Le rapport $\frac{\text{N urée}}{\text{N.NH}_3}$ faiblit un peu après chaque injection et le taux ammoniacal du sang ne s'accrut pas. En un mot, nous avons l'impression que nous avons fait pénétrer dans l'organisme un maximum de pouvoir diastasique, sans produire de lésions graves qui puissent annuller les fonctions défensives et productrices de corps antidiastasiques. Après la dernière injection de 40 cent. cubes seulement, qui était de beaucoup supérieure aux autres, on vit le taux ammoniacal du sang augmenter d'une façon nette et le chien perdre de sa vivacité. Il y avait, en effet, 0 gr. 004 N.NH₃ p. 1.000 de sang, alors que le taux s'était maintenu auparavant entre 0,0001 et 0,00003. Des prises de sang, faites à partir de la troisième injection, n'indiquent ni pouvoir urolytique, ni pouvoir antidiastasique du sérum. Après la sixième injection seulement, il se manifeste un très léger pouvoir urolytique et une présence très nette d'anticorps. Le sérum, mêlé à la macération diastasique *in vitro*, produit en quelques minutes un volumineux précipité qui augmente à l'étuve à 37°. Néanmoins tous nos efforts pour annihiler le pouvoir diastasique furent vains. Quelles que soient les proportions de sérum et de macération diastasique qui furent mélangées, nous n'obtinmes, en dehors de la précipitation, aucune diminution du pouvoir urolytique. Il n'y a dans le sérum du chien que des *précipitines des corps contenus dans la macération*, mais qui ne sont que les soutiens de la diastase. La diastase mêlée à du sérum précipitant dans les mêmes conditions que dans l'expérience précédente, filtrée après deux heures, d'étuve à 37° et séparée du précipité produit, a toujours une activité correspondant à celle de la diastase pure. Le support de la diastase, qu'on ne peut séparer par aucun procédé, produit dans l'organisme des anticorps capables de précipiter ce support ou une partie de ce

support sans toutefois toucher à la diastase. Peut-être y a-t-il là un procédé possible de purification des diastases. Mais ce n'était point là ce que nous recherchions.

b) Voie intraveineuse. — Nous avons tenté alors la voie intraveineuse qui paraît être la voie la plus active pour l'obtention d'anticorps, mais que nous n'avions pas utilisé d'emblée craignant d'affaiblir l'organisme en l'intoxiquant. A notre grand étonnement, et comme nous l'avons déjà dit, le chien supporta très bien ces injections et l'on put, par ce procédé, sans le moindre dommage introduire en cinq jours 50 cent. cubes de diastase, ce qui correspond à la dose toxique; vingt-quatre heures après la cinquième injection, le sang ne révéla ni pouvoir urolytique, ni pouvoir antidiastasique. Le chien a grossi de 1 kilogramme pendant le traitement. Nous injectons alors 39 de pouvoir diastasique par kilogramme, ce qui est nettement inférieur au pouvoir diastasique mortel. L'animal meurt rapidement (trois quarts d'heure au lieu de deux heures) avec le tableau habituel, la phase comateuse se manifestant plus rapidement après l'injection. *Le chien semble avoir été sensibilisé* par nos injections intraveineuses subintrantes, puisqu'il meurt plus vite avec des doses moindres, cependant que la production d' $N.NH_3$ dans le sang et les organes est identique aux autres expériences

Cette seconde expérience nous donna l'idée d'étudier l'*action sensibilisante* que pourraient avoir des injections intraveineuses successives. Sur ce chapitre nous sommes encore peu avancés. La seule expérience que nous ayons pu faire et qui ne nous a pas donné de résultats concluants est celle-ci : nous injectons à un chien une dose forte, mais non mortelle, de macération diastasique. L'animal, peu chargé en urée (0,056. N uréique), a tout son N uréique transformé en $N.NH_3$; mais, le taux n'étant pas mortel, le chien supporte très bien cette injection. Le surlendemain, on réinjecte au chien une dose faible (13 de pouvoir diastasique par kilogramme) et l'on étudie les modifications produites sur l'N uréique. Celles-ci paraissent être d'une intensité égale à celles produites par la même dose (13 de pouvoir diastasique par kilogramme) sans injection préparante. Nous ne tirons aucune conclusion actuelle de cette expérience qui devra être reprise méthodiquement pour

montrer s'il existe, ou non, une action sensibilisante nette.

Bien des points restent d'ailleurs encore à élucider : car la précision chimique des résultats donne à l'étude de l'uréase une grande importance pour la connaissance des lois relatives à l'action des diastases *in vivo*.

CONCLUSIONS

1^o ACTION DE L'URÉASE *in vitro* SUR LES HUMEURS DE L'ORGANISME.

— Nos expériences ont confirmé que l'uréase détruit totalement et rapidement l'urée du sang. Celui-ci n'exerce en quarante-huit heures aucune action empêchante sur la diastase ; en solution diluée il exerce une action nettement protectrice. Cette action est indépendante de la teneur en sels minéraux et de l'alcalinité du sérum, elle n'est pas due à une substance thermolabile à 65°.

2^o DESTINÉE DE L'URÉASE INJECTÉE DANS L'ORGANISME. — L'uréase disparaît lentement du milieu sanguin où on l'a injectée (vingt-quatre heures). On la retrouve fixée à des taux différents sur les divers organes. Le foie paraît être l'organe où elle se fixe le plus.

On ne retrouve jamais d'uréase dans l'urine.

3^o ACTION TOXINIQUE DE L'URÉASE *in vivo*. — *a)* Intoxication aiguë (par injection intraveineuse). L'action est rapide, la destruction totale de l'urée est pour ainsi dire instantanée. L'animal meurt d'ammoniémie en deux à trois heures.

b) Intoxication subaiguë (par injection sous-épidermique). L'action est plus lente et met quarante-huit heures à se développer. Le mécanisme d'intoxication est identique à celui de l'intoxication par injection intraveineuse.

c) Intoxication chronique (par injection intraveineuse ou sous-épidermique). Tant que la quantité d'uréase injectée n'arrive pas à produire une quantité d'ammoniaque supérieure à celle que le foie peut arriver à détruire, l'animal résiste. Il meurt dès que l'organisme commence à s'enrichir en NH_3 .

En général ces intoxications sont comparables à celles obtenues par l'injection de sels ammoniacaux à acides faibles.

L'ammoniémie produite par la diastase aboutit à une intoxication de type cérébral caractérisée d'abord par des convulsions, puis par du coma.

La mort survient lorsque l'ammoniémie atteint le seuil de 0,07 d'azote ammoniacal par kilogramme de sang.

d) Intoxication *per os*. Nous ne sommes pas arrivés à réaliser une intoxication par ce mode d'introduction.

e) Intoxication intracérébrale. On a reproduit l'intoxication ammoniémique en injectant directement la diastase dans le cerveau, la neurolyse est comparable à celle obtenue par injection veineuse.

4^o ACTION RÉVERSIVE DU FOIE. — Nous avons mis en lumière l'action réversive du foie en supprimant fonctionnellement cet organe, soit par injections de chloroforme, soit par ligature de la veine porte. Dans ces cas l'intoxication ammoniacale se produit plus rapidement puisque l'action réversive du foie n'entre pas en jeu.

5^o ANTICORPS ET SENSIBILISATRICE. — Nous ne sommes pas arrivés à faire produire à l'organisme du chien une antidiastase. Nous avons obtenu simplement une précipitine du support de la diastase.

Nous n'avons pu mettre en évidence la sensibilisation de l'organisme à l'action de la diastase par des injections préparantes.

RECHERCHES SUR LES PROTÉIQUES DE LA LEVURE

par PIERRE THOMAS.

PREMIÈRE PARTIE

PRÉPARATION DES PROTÉIQUES DE LA LEVURE

Les premiers essais systématiques d'extraction des protéiques de la levure remontent à l'année 1844; c'est Schlossberger (1) qui, le premier, en a extrait par l'action de la potasse étendue, suivie de filtration et de précipitation par l'acide sulfurique, un corps contenant de 13,75 à 14 p. 100 d'azote et possédant quelques-unes des réactions colorées des protéiques. Nægeli et Lœw, dans leurs recherches sur la composition chimique de la levure (2), extraient soit par macération, soit par ébullition avec l'eau, des corps mal définis, paraissant appartenir au groupe des protéines simples.

Jusque-là, la teneur de la levure en protéiques est loin d'être fixée. Ainsi Payen (3) indique une teneur en matière azotée de 62,73 p. 100, tandis que Nægeli et Lœw donnent 45 p. 100 de protéiques avec 2 p. 100 de peptones et 4 p. 100 de matières extractives (azotées?). D'après Stutzer (4), sur une teneur de 7,77 p. 100 en azote de la levure, 3,519 p. 100 appartiennent aux protéines et 2,257 p. 100 aux nucléines, soit un rapport de 5/7 à 2/7 environ. D'autre part, il y aurait 63,80 p. 100 d'albumines et 26,10 p. 100 de nucléines.

Bokorny (5), sans chercher à extraire les matières protéiques elles-mêmes, fixe la quantité d'albumine que renferme la levure à 3,50 — 9,00 p. 100.

(1) SCHLOSSBERGER. *Liebig's Ann. d. Chem. u. Pharmazie*, 1844, 51, p. 193.

(2) NÆGELI et LŒW. *Journ. f. prakt. Chem.*, 1878, 47, p. 403, et aussi *Liebig's Ann.*, 193, p. 322.

(3) PAYEN. *Mémoires présentés par divers savants étrangers*, 9, p. 32.

(4) STUTZER. *Zeitsch. physiol. Chem.* 1882, 6, p. 572.

(5) BOKORNY. *Ztsch. f. Spiritus industrie*, 1880, 13, p. 23.

En somme, aucun des précédents auteurs n'a eu entre les mains de produits correspondant vraiment à ceux qui forment le protoplasma de la levure. Il fallait la méthode de Buchner pour arriver à extraire le contenu cellulaire et expérimenter avec lui. E. Buchner signale déjà un fait précis : c'est que le suc de presse qu'il obtient renferme « des albumines coagulables comme celles des organes des animaux » (1). Mais c'est Wroblewski (2) qui extrait le premier du suc de levure de Buchner des protéines. Il procède par coagulations successives et obtient des corps coagulant à 41°, 51°, 56°, 59°, 62° et 68° ; il montre que ces corps précipitent par saturation partielle ou totale avec le sulfate d'ammonium ou par addition d'alcool.

Quelques années plus tard, R. Schröeder (3) réussit, par une méthode différente, à préparer des protéiques coagulables en partant de la levure. Il mélange la levure pressée avec de l'éther, qui détermine une plasmolyse énergique. La masse se liquéfie, et abandonne alors à l'eau une substance que l'on peut en séparer en la coagulant par chauffage à l'ébullition. Ce produit, lavé et séché, renferme C = 52,38; H = 6,91; N = 15,80 à 15,92; S = 0,72; P = 0,06; cendres = 0,14. Il possède la plupart des réactions des protéiques (4).

Enfin, Sedlmayr (5) aurait pu obtenir une albumine coagulable en traitant par une solution de carbonate d'ammonium de la levure tuée par l'alcool.

Je ne dois pas oublier de mentionner que, bien avant ces recherches, A. Kossel (6) avait réussi à extraire de la levure d'autres produits définis, appartenant au groupe des nucléines ; mais il s'agit évidemment ici de produits dus à l'action des réactifs et non préexistants dans la cellule. Kossel traite la levure lavée par de la soude très diluée, filtre et recueille le liquide filtré dans l'acide chlorhydrique étendu. Il obtient un

(1) E. BUCHNER, H. BUCHNER et M. HAHN. *Die Zymasegährung*, Munich et Berlin, 1903, p. 73.

(2) WROBLEWSKI. *Ber. deuts. chem. Gesell.*, 1898, **31**, p. 3218.

(3) R. SCHROEDER. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1902, **2**, p. 389.

(4) La méthode employée par Schröeder avait déjà fait l'objet d'un brevet pris en 1899 par H. Buchner et M. Gruber. La même année, Dormeyer (*Woch. f. Brauerei*, 1899, **16**, p. 557) avait conseillé l'emploi d'éther et de chloroforme ; un peu plus tard, Hahn et Geret (*Zeitsch. f. Biol.*, 1900, **40**, p. 117) utilisent dans le même but le chloroforme.

(5) SEDLMAYR. *Zeitsch. f. d. gesam. Brauwesen*, 1903, **26**, p. 381.

(6) A. KOSSEL. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1879, **3**, p. 284; 1880, **4**, p. 290.

précipité qui, après lavage, présente la composition : C = 40,81 ; H = 5,38 ; N = 15,98 ; P = 6,49 ; S = 0,38. Dans des préparations ultérieures, il trouve pour le phosphore les valeurs : 3,28 ; 3,55 ; 3,94 et ne réussit pas à obtenir un corps aussi riche en phosphore que la première fois. Il observe ensuite que ce produit laisse par ébullition avec de l'eau des bases puriques, surtout l'hypoxanthine ; plus tard, il en extrait également la xanthine et la guanine.

La constitution des substances ayant pour origine le noyau de la cellule de levure était donc assez bien connue, tandis que presque rien n'était fait relativement aux matières protoplasmiques de cette même cellule. Malgré les difficultés d'une semblable étude, j'ai essayé de l'aborder, afin d'éclairer, s'il était possible, par l'étude des propriétés et de la structure des protéiques de la levure, leur origine et leur formation.

Extraction des protéiques de la levure.

La meilleure méthode, semble-t-il, pour isoler les constituants du protoplasme de la levure, consiste à faire exsuder celui-ci hors de l'enveloppe cellulaire, par un phénomène osmotique, ou par déchirure de cette enveloppe. C'est en somme la base des procédés employés pour l'obtention de la zymase.

Dès 1897, E. Buchner (1) obtient, par broyage des cellules de levure avec du sable quartzé et de la terre d'infusoires, puis expression sous une pression élevée, un « suc de presse » qui contient avec les protéiques de la levure la zymase.

Au début de 1911, A. Lebedew (2) fait connaître une méthode beaucoup plus simple : il exprime de la levure fraîche de façon à en retirer la plus grande quantité de l'eau interposée, puis dessèche la masse pulvérulente, soit à la température ordinaire, soit mieux vers 30°. Il suffit de faire macérer la poudre obtenue avec de l'eau pendant plusieurs heures, puis de filtrer sur papier, pour obtenir une macération riche en protéiques et fortement zymasique.

A la fin de la même année, Giglioni (3) a montré que de la

(1) E. BUCHNER. *Ber. deuts. chem. Gesell.*, 1897, **30**, p. 417.

(2) A. LEDEDEW. *C. R. Acad. des Sciences*, 1911, **152**, p. 49.

(3) GIGLIONI. *Atti della Soc. ital. p. Progresso d. Scienze*, octobre 1911.

levure exprimée jusqu'à ce qu'elle soit devenue pulvérulente, puis exposée aux vapeurs de chloroforme, d'éther, d'eucalyptol ou de camphre, se liquéfie et donne par filtration un liquide zymasique.

Cette dernière méthode correspond en somme au procédé de Schröder pour la préparation des protéiques de levure. En répétant les expériences de ce dernier auteur, il m'a paru que les produits obtenus, ainsi que le rendement, sont sujets à d'assez grandes variations. Les diastases protéolytiques ne sont pas suffisamment entravées dans leur action et par suite le résultat de la préparation est souvent incertain ; c'est ce qui m'a déterminé à abandonner cette méthode.

J'aurais pu, en préparant le suc de presse de Buchner, refaire et compléter le travail de Wroblewski ; mais la préparation du suc de levure par broyage et expression est assez pénible, surtout lorsque l'on doit opérer sur des quantités un peu considérables ; elle exige, en plus du matériel spécial indispensable, un personnel suffisant.

Il n'en est plus de même si on emploie le procédé indiqué par Lebedew pour la préparation de son suc de levure : cette remarquable méthode présente la commodité et la simplicité les plus grandes, et il devient facile d'opérer sur des quantités quelconques. Il ne restait qu'à adapter les données de l'auteur au but spécial poursuivi, c'est-à-dire d'une part extraire et séparer les protéiques de la levure, et d'autre part empêcher leur altération en augmentant le rendement.

Mes premiers essais ont été effectués avec une préparation industrielle de levure obtenue d'après les indications de Lebedew (1). La première idée qui se présentait naturellement à l'esprit était de déterminer la proportion relative d'azote sous forme coagulable et non coagulable existant dans la macération préparée d'après Lebedew, mais en ajoutant un volume beaucoup plus considérable d'eau, afin de mieux épuiser cette levure.

Dans ce but, 200 grammes de levure Schroder, pulvérisée au préalable, ont été délayés dans 600 cent. cubes d'eau et la macération laissée à l'étuve à 35° pendant quatre heures, en agitant de temps à autre. On filtre ensuite

(1) Préparée par Schroder, de Munich, sous le nom de Trockenhefe.

sur papier Chardin; après dix-huit heures, on recueille un volume de 190 cent. cubes (liquide A).

Le résidu de l'épissage, resté sur le filtre, est délayé dans 600 cent. cubes d'eau et remis à l'étuve à 35°. Après quatre heures et demie, on filtre; on recueille 500 cent. cubes (liquide B).

Enfin, le résidu a été de nouveau délayé dans 600 cent. cubes et macéré cinq heures à 35°. On recueille par filtration 450 cent. cubes (liquide C).

Pour déterminer la quantité de substances coagulables contenue dans ces liquides, on en prélève exactement 5 cent. cubes (aussitôt après filtration), on ajoute 50 cent. cubes d'eau et 1 gramme de chlorure de sodium, puis on porte à l'ébullition après addition de quelques gouttes d'acide acétique. La réaction est nettement acide. On filtre sur un petit filtre sans plis, en papier Chardin, et on lave jusqu'à ce qu'une goutte, recueillie sur un verre de montre, ne donne plus de touche sensible par le nitrate d'argent. Le coagulum est alors détaché du filtre et séché à 110° jusqu'à poids constant.

D'autre part, les liquides filtrés après coagulation sont évaporés à sec et on y dose l'azote total par la méthode de Kjeldahl.

Comme il est facile de s'en rendre compte, les liquides restant après coagulation renferment à peu près autant d'azote que le coagulum obtenu.

Les liquides A, B et C, aussitôt recueillis, sont additionnés de leur volume d'une solution saturée de sulfate d'ammonium; il se fait un léger précipité que l'on sépare par filtration et le liquide légèrement acidulé est aussitôt coagulé par chauffage à 100° pendant une demi-heure. Le coagulum lavé à l'eau bouillante est ensuite essoré et lavé jusqu'à disparition du sulfate d'ammonium.

Les liquides A, B et C donnent toutes les réactions de précipitation des protéiques :

Par les acides (sulfurique, nitrique, chlorhydrique, trichloracétique, acétique).	précipité blanc.
— l'acide phosphotungstique.	blanc.
— le ferrocyanure acétique.	blanc jaunâtre.
— l'acide picrique.	jaune.
— l'iодure de potassium et de mercure.	jaunâtre.
— l'iодure de potassium et de bismuth.	orangé.
— le chlorure mercurique.	blanc.
— le chlorure de platine.	jaunâtre.
— l'iодure de potassium iodé.	jaune.
— l'acide métaphosphorique.	blanc.

Ces liquides, aussi bien que le coagulum purifié, donnent toutes les réactions colorées des protéiques; ces réactions n'ont pas la même intensité :

Xanthoprotéique, MILLON, biuret.	intense.
HOPKINS	moyenne.
LIEBERMANN	très intense.
Aldéhyde d'EHRICH et acide sulfurique . . .	rouge très intense.
Soufre.	faible.

Il s'agit donc d'une protéine soluble à l'eau et coagulable par la chaleur, vraisemblablement du groupe des albumines.

De nombreux essais ont été entrepris afin d'augmenter le rendement en protéiques, par l'emploi de solvants divers, et en faisant varier la durée de la macération. Il résulte de ces expériences que l'extraction à l'eau salée est défavorable, mais celle à l'eau alcaline donne des rendements plus élevés qu'avec l'eau pure.

Étant donné que les macérations deviennent peu à peu acides et que cette réaction favorise l'endotryptase de la levure, ainsi que l'ont montré Hahn et Geret (1), il n'y a rien de surprenant à ce que les matières coagulables soient plus abondantes dans l'extrait fait au moyen d'eau alcaline.

Hahn et Geret donnent les chiffres suivants pour le poids de coagulum formé dans le suc de levure lorsque l'on ajoute des quantités variables de carbonate de sodium :

Carbonate de sodium	Poids de coagulum
0.	28,1
Q. S. pour neutraliser.	43,0
0,2 p. 100 en plus	59,2
0,5 — — —	72,3

J'ai essayé de maintenir la réaction à peu près neutre par addition progressive de carbonate de sodium.

Une macération de 100 grammes de levure Schroder dans 600 cent. cubes d'eau, abandonnée neuf heures dans l'étuve à 35°, a été ramenée toutes les heures à une très légère alcalinité par addition d'une solution concentrée de carbonate de sodium. On a recueilli par filtration 400 cent. cubes de liquide limpide opalescent.

Coagulum obtenu : 2 gr. 22 p. 100 contenant azote coagulable. . . 0,355 p. 100
 — 2 gr. 22 — — non coagulable 0,372 —
 Poids de coagulum : 2,22 × 4 = 8 gr. 88.

Le rendement est visiblement supérieur, mais il est évidemment peu pratique de surveiller sans cesse la macération pour en maintenir la neutralité.

(1) M. HAHN et L. GERET. *Die Zymasegährung*, 2^e partie, p. 318.

L'influence de quantités croissantes d'alcali sur le rendement a été alors examinée.

Il en ressort que la concentration en carbonate de sodium la plus favorable, dans les conditions de l'expérience (durée, dilution, température), est de 0,50 p. 100.

Il fallait aussi fixer le rôle de la température. Dans ce but, on a fait une série d'essais, d'après lesquels on est fondé à employer la température de 35°.

Ces conditions, macération dans un assez grand volume de liquide, emploi d'eau alcalinisée avec 0,5 p. 100 de carbonate de sodium, température de 35°, donnent les meilleurs résultats pour une préparation rapide et pratique des protéiques de la levure. Le rendement serait certes amélioré par d'autres précautions : épuisements réitérés, contrôle continual de la réaction légèrement alcaline qu'il faudrait maintenir, etc., mais le procédé deviendrait d'une application vraiment pénible et exigerait trop de temps.

Lorsque l'on opère sur des masses un peu considérables, en plaçant la macération à l'étuve, il ne faut pas oublier que l'opération doit être prolongée assez longtemps, en raison de la lenteur avec laquelle la température s'élève. Pour une macération de 100 grammes de levure Schroder dans un litre d'eau alcaline, laissée pendant huit heures à l'étuve à 35°, l'élévation à partir d'une température initiale de 18° n'est que de 5° en moyenne pendant les deux premières heures et de 4° pendant la troisième. Ce n'est guère qu'après cinq heures que la température est voisine du degré cherché. Aussi est-il préférable d'employer de l'eau préalablement chauffée à 35° si on veut diminuer la durée de la macération.

Séparation des protéiques obtenus.

Nous avons vu précédemment que le produit de l'épuisement de la levure séchée de Schroder par l'eau donne avec le sulfate d'ammonium à demi-saturation un léger précipité. S'agit-il d'une globuline? Quelle est la nature du protéique coagulable par la chaleur? Est-il formé d'une substance unique? Autant de questions auxquelles je me suis efforcé de répondre.

Une macération aqueuse de 100 grammes de levure Schroder dans six parties d'eau distillée, prolongée sept heures et demie à la température de 35°, a donné, après filtration, 370 cent. cubes de liquide renfermant 1,77 p. 100 de protéiques, soit en tout 6 gr. 55; le liquide contient 0,34 p. 100 d'azote non coagulable. Une certaine quantité de ce liquide, additionnée de son volume de solution saturée de chlorure de sodium, ne donne aucun trouble, même après contact prolongé; il ne renferme donc pas de globulines du groupe du fibrinogène.

On prend 100 cent. cubes de la macération primitive et on les sature à froid, en agitant, avec du sulfate de magnésium cristallisé en poudre fine. On termine la saturation à l'étuve à 28°. Le trouble assez abondant qui se forme est séparé par filtration et le dépôt lavé avec un peu de solution saturée de sulfate de magnésium. On redissout dans l'eau la partie insoluble, on filtre, on acidule par l'acide acétique et on chauffe à l'ébullition. Il se fait une coagulation incomplète; le liquide filtré reste, en effet, opalescent et renferme encore une notable quantité de protéiques. Quant au coagulum resté sur le filtre, lavé à l'eau bouillante jusqu'à disparition de réaction des sulfates, il pèse après dessiccation 10 gr. 646, soit environ 36 p. 100 de la quantité totale. Ce coagulum paraît renfermer une certaine quantité d'une albumine coagulable entraînée par la précipitation saline en même temps qu'un autre protéique, ce dernier ne se séparant pas complètement par chauffage. Il convient donc de faire des essais de purification par précipitations répétées.

Dans ce but, on prépare une nouvelle macération dont on obtient par filtration 560 cent. cubes contenant 9 gr. 57 de protéiques. On précipite par un volume de solution saturée de sulfate d'ammonium, on filtre et le résidu est traité par une petite quantité d'eau. La dissolution est incomplète; on centrifuge et on obtient un premier résidu insoluble R_4 . Le liquide clair, dont le volume est de 92 cent. cubes, est reprécipité par son volume de sulfate d'ammonium à saturation: précipité blanc floconneux, qui est traité à deux reprises par peu d'eau, en présence de quelques gouttes de solution saline. On centrifuge et on a un second résidu R_2 . En traitant de même la liqueur claire décantée, on a un troisième résidu insoluble R_3 .

Les liquides résultant des dernières dissolutions par l'eau contenant seulement une petite quantité de sels, étant acidulés par l'acide acétique et portés à l'ébullition, ne donnent qu'un léger louche sans coagulum visible dans le dernier cas. Il n'existe donc plus d'albumine coagulable. Quant aux résidus R_1 , R_2 , R_3 , insolubles dans l'eau contenant seulement de très petites quantités de sels, ils se dissolvent dans l'eau alcalinisée par 0,5 p. 100 de carbonate de sodium. La solution est complète, légèrement opalescente et filtre assez facilement. Par addition d'acide acétique dilué, on a un précipité floconneux blanc qui se redissout en entier dans l'eau alcaline et reprécipite par l'acide acétique.

Ce produit est très riche en azote, comme le montre un essai rapide; on le fond avec un mélange de potasse et de nitrate de potassium pour y rechercher la présence du phosphore. La recherche est positive et montre la présence d'une quantité notable de cet élément. La recherche du fer est également positive.

Cette expérience, répétée dans les mêmes conditions avec une macération dans l'eau salée à 10 p. 100, donne les mêmes résultats, à savoir que le précipité obtenu par le sulfate de magnésium ou par le sulfate d'ammonium à demi-saturation ne se redissout après purification que dans les solutions alcalines; il en est reprécipité par les acides et contient du phosphore et du fer.

Ces caractères ne paraissent pas correspondre avec ceux d'une globuline vraie. Afin de voir si la précipitation saline correspond à celle faite au moyen des acides, on dispose l'expérience suivante.

Une macération de 100 grammes de levure Schroder dans six parties d'eau distillée est maintenue au voisinage de la neutralité par additions fréquentes de carbonate de sodium à 10 p. 100. Le séjour à l'étuve à 35° est de neuf heures. On filtre et on recueille 420 cent. cubes de liquide contenant 2,22 p. 100 de protéiques coagulables et 0,37 p. 100 d'azote non coagulable.

On prélève deux portions égales de 200 cent. cubes de liquide. L'une est précipitée par son volume de solution saturée de sulfate d'ammonium: on filtre et on redissout dans une solution de carbonate de sodium à 0,5 p. 100, on filtre à nouveau et on reprécipite par l'acide acétique. Le précipité séché dans le vide sur l'acide sulfurique pèse 0 gr. 24. Quant au liquide primitif, il est dialysé pendant quelques heures dans des sacs de collodion pour le débarrasser de la plus grande partie du sulfate d'ammonium, puis acidulé et coagulé par la chaleur. Le coagulum lavé et séché pèse 3 gr. 04.

On retrouve ainsi $0,24 + 3,04 = 3$ gr. 28 sur 4 gr. 44 de protéiques.

La seconde portion de 200 cent. cubes est précipitée par 2 cent. cubes d'acide acétique, soit 1 p. 100; on filtre rapidement et le précipité est redissous dans le carbonate de sodium à 0,5 p. 100. On reprécipite par l'acide acétique ajouté goutte à goutte, on lave et on sèche dans le vide sulfurique. Poids obtenu: 0 gr. 49. Le liquide filtré après la précipitation acétique est aussitôt coagulé par la chaleur; on obtient après lavage et dessiccation 3,26 de coagulum.

On retrouve ainsi $0,19 + 3,26 = 3$ gr. 45 sur 4 gr. 44 de protéiques.

Comme on le voit, les deux expériences sont comparables. Elles laissent toutes deux place pour une autolyse accentuée qui se traduit par une perte de 23 à 26 p. 100 de protéiques.

Il est beaucoup plus commode, pour séparer les deux substances présentes dans les macérations, de recourir à la précipitation acétique. Afin de fixer les proportions relatives de ces protéiques tout en améliorant le rendement, on procède à l'expérience suivante: trois échantillons de levure Schroder

ont été mis à macérer dans dix parties d'eau alcaline pendant huit heures à 35°.

A. — *Macération dans le carbonate de sodium à 0,1 p. 100.*

Volume obtenu : 760 c. c. contenant 0,78 p. 100 de protéiques coagulables, soit en tout 5 gr. 928 et 0,227 p. 100 d'azote non coagulable.

On précipite par l'acide acétique; le précipité essoré et séché dans le vide pèse 1 gr. 31. Le liquide filtré, coagulé par chauffage, donne après lavage et dessiccation un poids de 4 gr. 66 de protéiques.

$$\text{Rapport : } \frac{1,31}{4,66} = \frac{22}{78} = \frac{1}{3,5} \text{ environ.}$$

B. — *Macération dans le carbonate de sodium à 0,2 p. 100.*

Volume obtenu : 760 c. c. contenant 0,92 p. 100 de protéiques coagulables, soit en tout 6 gr. 992 et 0,218 p. 100 d'azote non coagulable.

Poids du précipité acétique : 1 gr. 54.

Poids du coagulum : 6 gr. 04.

$$\text{Rapport : } \frac{1,54}{6,04} = \frac{20}{80} = \frac{1}{4} \text{ environ.}$$

C. — *Macération dans le carbonate de sodium à 0,5 p. 100.*

Volume obtenu : 740 c. c. contenant 1,28 p. 100 de protéiques coagulables, soit en tout 9 gr. 47 et 0,213 p. 100 d'azote non coagulable.

Poids du précipité acétique : 1 gr. 57.

Poids du coagulum : 7 gr. 91.

$$\text{Rapport : } \frac{1,57}{7,91} = \frac{46,5}{83,5} = \frac{1}{2} \text{ environ.}$$

D'une façon générale, on voit que les quantités relatives des deux substances varient peu : cependant, l'élévation du taux de l'alcalinité, qui gêne de plus en plus l'autolyse de la levure, ne paraît pas influer beaucoup sur la quantité du précipité acétique, tandis qu'elle augmente la teneur en albumine coagulable. On pourrait en conclure que la substance précipitable par l'acide acétique n'est pas produite par un processus d'autolyse ou de dissolution, mais se trouve déjà formée dans le contenu cellulaire. Il en est probablement de même de l'albumine coagulable par la chaleur; celle-ci apparaît en quantité d'autant plus élevée que l'alcalinité est plus grande parce qu'elle est beaucoup plus attaquable que l'autre protéique, en milieu acide, sous l'action de l'endotryptase. Quoi qu'il en soit, le rendement est le meilleur lorsque l'extraction est faite avec une solution de carbonate de sodium à 0,5 p. 100.

Les proportions des deux protéiques, dans l'expérience qui

précède, restent voisines de une partie du premier pour quatre parties du second. Cependant, elles semblent sujettes à varier dans des limites assez étendues. Le rendement en protéique précipitable par l'acide acétique est plus élevé lorsque l'on opère en plus grand, avec une quantité de levure atteignant 400 à 800 grammes. Il varie aussi avec l'espèce de levure, mais sans qu'il soit possible de fixer une limite certaine en raison de l'impossibilité de supprimer complètement l'action de la protéolyse.

Dans une expérience faite avec 700 grammes de levure Schroder, délayée dans dix parties d'eau alcalinisée avec 0,50 p. 100 de carbonate de sodium et macérée huit heures à 35-36°, j'ai obtenu 49 grammes d'albumine coagulable, lavée et séchée à 110°, et 20 grammes de précipité acétique purifié par dissolution et reprécipitation, lavé et séché dans le vide sulfurique.

D'autre part, j'ai opéré avec la levure pressée du commerce. Deux kilogrammes de cette levure (1), exprimés fortement à la presse et tamisés, donnent une poudre blanche qui est séchée en couche mince à l'étuve à 38° pendant quarante-six heures. On broie finement dans un moulin pour pulvériser les grains de couleur jaune brun qui se sont formés. La poudre, dont le poids est de 400 grammes, est mise à macérer dans dix parties d'eau contenant 0,3 p. 100 de carbonate de sodium pendant sept heures à l'étuve à 35°. On obtient seulement 22,8 d'albumine et 9,5 de précipité acétique purifié par dissolution et reprécipitation comme plus haut. Voici les résultats comparatifs :

	Levures	
	SCHRODER	SPRINGER
Précipité acétique p. 100 de levure	2,9	2,4
Albumine coagulable	7,0	5,7
Rapport entre les deux protéiques	1 : 2,4	1 : 2,3
Rendement total.	9,9	8,0

Je me suis finalement arrêté au procédé suivant pour la préparation de ces protéiques :

1) Il s'agissait de levure Springer préparée à Maisons-Alfort.

La levure préparée selon les données de Lebedew est pulvérisée aussi finement que possible par passage dans un moulin à serrage variable, analogue à ceux que l'on emploie pour pulvériser les graines dures. La poudre est délayée avec soin dans dix parties de solution de carbonate de sodium (carbonate sec et pur) à 0,5 p. 100 préalablement chauffée à 37-38°. On abandonne huit heures à l'étuve à 35° en agitant assez souvent. La masse est alors mélangée et répartie dans des filtres en papier Chardin disposés dans une glacière (entre + 2° et + 5°). Le lendemain les liqueurs filtrées sont réunies et précipitées par addition de 1 p. 100 d'acide acétique cristallisable. On vérifie que la précipitation est totale et on décante sur un filtre — ou on centrifuge si possible — de manière à séparer le précipité aussi rapidement que possible. Le liquide clair est additionné de 1 p. 100 de sel marin et porté rapidement à l'ébullition.

Le précipité acétique, lavé rapidement avec un peu d'eau, est dissous dans le moins possible de solution de carbonate de sodium à 0,5 p. 100. On filtre ou on centrifuge s'il est besoin et la solution est reprécipitée par l'acide acétique en quantité exactement nécessaire. On centrifuge, on lave à plusieurs reprises par centrifugation et on sèche dans le vide sulfurique. Toutes ces opérations doivent être faites aussi rapidement que possible.

Quant au coagulum obtenu par la chaleur, il est recueilli sur un filtre, lavé à l'eau bouillante à plusieurs reprises, essoré et séché à l'étuve à 105-110°.

DEUXIÈME PARTIE

NATURE DES PROTÉIQUES DE LA LEVURE

Etude du précipité fourni par l'acide acétique.

Ce corps semble se rapprocher par ses propriétés des nucléoprotéines ou plutôt de ces corps désignés improprement comme paranucléoprotéines et qui pour la plupart rentrent dans le groupe des phosphoprotéines (1). Je l'ai d'abord purifié par plusieurs dissolutions dans l'eau alcaline suivies de précipitations à l'acide acétique, ces opérations étant faites très rapidement grâce à l'emploi d'une centrifugeuse et au voisinage de 0°.

Le produit obtenu, après dessiccation à 35° dans le vide sulfurique, se présente sous forme d'une masse cornée, dure, donnant par pulvérisation au mortier une poudre jaune pâle. Il est insoluble dans l'eau, mais se dissout un peu dans une solution de sel marin à 10 p. 100 ; cette solution ne se coagule

(1) Pour la classification des protéiques voir *Proceed. of Amer. physiol. Society*, 20^e ann. Comm., 1908.

pas par chauffage. On peut le dissoudre beaucoup plus facilement dans les carbonates alcalins et dans les alcalis très étendus, ainsi que dans l'eau de chaux. Les acides minéraux et l'acide acétique le précipitent de ces solutions. Dans la solution alcaline, l'acide phosphorique fait naître un précipité qui se redissout par un léger chauffage et reparait par refroidissement.

DOSAGE DE L'AZOTE. — Ce dosage a été fait par la méthode de Kjeldahl, avec la modification de Maquenne (distillation avec l'hypophosphite de sodium) sur trois échantillons provenant de trois préparations différentes et préalablement séchés à 110° jusqu'à poids constant.

I.	0 gr. 1715	de substance	exigent	9 c.c. 9	$\text{SO}_4^{\text{H}_2\text{N}/5}$	soit 16,16	p. 100 N.
II.	0 gr. 2225	—	—	12 c.c. 8	—	16,107	—
III.	0 gr. 2690	—	—	15 c.c. 55	—	16,18	—

DOSAGE DU SOUFRE. — Un premier dosage a été fait par fusion de la substance avec un mélange de une partie de nitrate de potassium et neuf parties de carbonate de potassium. On redissout dans l'acide chlorhydrique et après filtration on précipite par le chlorure de baryum. On pèse le sulfate après lavage.

I.	2 gr. 624	de substance	donnent	0 gr. 074	BaSO_4	soit 0,387	p. 100 S.
----	-----------	--------------	---------	-----------	-----------------	------------	-----------

Un second échantillon a été traité par l'acide nitrique bouillant; après dissolution, on neutralise avec du carbonate de sodium, on évapore à sec et on chauffe au rouge dans un creuset de nickel. On reprend par l'acide chlorhydrique et on filtre. Le filtre et le charbon restant étant incinérés, on reprend par l'acide chlorhydrique et les liqueurs réunies sont précipitées par le chlorure de baryum.

II.	1 gr. 640	de substance	donnent	0 gr. 0457	BaSO_4	soit 0,382	p. 100 S.
-----	-----------	--------------	---------	------------	-----------------	------------	-----------

DOSAGE DU PHOSPHORE. — La substance préalablement séchée à 110° et pesée a été mélangée intimement avec 0 gr. 20 de magnésie calcinée pure et incinérée avec précaution suivant les indications de Vozarik (1). On précipite à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien.

(1) A. VOZARIK. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1912, **76**, p. 426.

I. 0 gr. 6765 de substance donnent 0 gr. 0425 $P^3O^7Mg^2$, soit 1,75	p. 100 P.
II. 1 gr. 0480	— 0 gr. 0690 — 1,835 —

DOSAGE DES CENDRES. — Les deux échantillons ayant servi aux dosages ci-dessus ont donné, par incinération au four à mousle, au voisinage du rouge sombre, des cendres en quantité minime.

I. 1 gr. 282 de substance donnent 0 gr. 0055 de cendres, soit 0,42	p. 100
II. 1 gr. 454	— 0 gr. 0037 — 0,25 —

Ces cendres sont alcalines, entièrement solubles, et contiennent du phosphate et du sulfate de sodium et de potassium.

La substance donne les réactions colorées des protéiques à des degrés variables. Les réactions du biuret, de Millon, xanthoprotéique, sont intenses. La réaction glyoxylique est très nette; celle de Liebermann passe très rapidement au rouge brun foncé et celle de Molisch donne un rouge violet très intense. Enfin la réaction du soufre (par formation du sulfure de plomb) est naturellement peu intense.

* * *

Les propriétés de ce corps phosphoré me semblent devoir le rapprocher des substances du groupe de la caséine, je l'ai soumis à une étude comparative avec la caséine et l'ovovitelline.

J'ai déjà indiqué la faible solubilité de cette substance dans l'eau salée à 10 p. 100 et sa facile dissolution dans l'eau de chaux. Il était intéressant de déterminer la concentration en ions hydrogène nécessaire pour produire le début de la précipitation des trois protéiques à comparer. Dans ce but on a ajouté des quantités croissantes d'acide phosphorique à leurs solutions sodiques, en présence d'une série convenablement choisie d'indicateurs (hélianthine, rouge de méthyle, rouge neutre, naphtolphthaléine, phénolphthaléine) (1).

Si on appelle c la concentration en ions hydrogène, on a (Sørensen) :

$$c = 10^{-p_H}.$$

(1) Je suis redevable de cette collection d'indicateurs à mon ami L. Mar-gaillan, à qui j'adresse ici mes meilleurs remerciements.

L'exposant p_H a pour valeur, avec les indicateurs choisis :

	Acide	Alcalin
Hélianthine	—	—
Rouge de méthyle	3,4	4,4
Rouge neutre	4,2	6,3
Naphtol-phthaléine	6,8	8,0
Naphtol-phthaléine	7,4	8,5
Phénol-phthaléine	8,3	9,2

Avec la phosphoprotéine de levure, on peut voir que la précipitation n'a pas lieu en milieu alcalin à la phénolphthaléine ; elle se produit en milieu alcalin à l'hélianthine, alcalin au rouge de méthyle mais encore acide au rouge neutre ; le point de précipitation est donc compris entre $p_H = 6,3$ et $p_H = 6,8$.

En opérant de même avec de la caséine purifiée par plusieurs dissolutions et précipitations successives, on trouve que celle-ci précipite en milieu encore alcalin à l'hélianthine et acide au rouge neutre. La précipitation correspond très exactement au point neutre du rouge de méthyle, soit entre $p_H = 4,2$ et $p_H = 6,3$.

J'ai alors préparé de l'ovovitelline de la manière suivante :

Deux jaunes d'œuf très frais, dilués avec 40 cent. cubes de solution de sel marin à 10 p. 100, sont épuisés par l'éther à plusieurs reprises, jusqu'à ce que ce dissolvant n'extraie plus qu'une trace infime de corps gras. Le liquide salé est siphonné et précipité par 20 volumes d'eau. On filtre, on essore et on lave le précipité à l'eau distillée ; enfin, on redissout dans le plus petit volume possible d'eau salée à 10 p. 100 et on recommence la précipitation encore une fois.

La vitelline obtenue, encore une fois dissoute dans l'eau salée, est de nouveau reprécipitée. Une petite quantité de ce précipité étant dissoute dans quelques gouttes de soude normale, on étudie la précipitation par l'acide phosphorique ; on peut constater qu'elle a lieu en milieu déjà acide à la phénolphthaléine, mais encore alcalin à la naphtolphthaléine ; soit entre $p_H = 8,3$ et $p_H = 8,5$.

A noter que la vitelline, très peu soluble dans l'eau de chaux, se dissout très facilement dans l'eau salée à 10 p. 100 ; cette dernière solution est coagulable par la chaleur, à l'inverse de ce qui a lieu pour la caséine et la phosphoprotéine de levure.

Tous les caractères qui rapprochent cette phosphoprotéine

de levure de la caséine du lait rendaient nécessaire une comparaison basée sur l'action des présures soit animales, soit végétales.

J'ai choisi comme présure animale une solution d'un comprimé de présure Hansen du commerce dans 50 cent. cubes d'eau, et comme présure végétale une solution de papayotine de Merck à 0 gr. 2 pour 50 cent. cubes.

Des solutions à 4 p. 100 environ de phosphoprotéine de levure et de caséine dans la soude N/10 ont été additionnées d'acide phosphorique, la première jusqu'à légère acidité au rouge neutre, la seconde jusqu'à neutralité au même indicateur.

On place dans un bain réglé à 45° deux tubes contenant 10 cent. cubes de chaque solution auxquels on ajoute respectivement 1 cent. cube de chacune des solutions de présure. Après quelques instants, il est facile d'observer une forte augmentation de la viscosité des liquides. Si on ajoute à chacun des mélanges, avant de les placer au bain-marie, une goutte de solution de chlorure de calcium, on obtient une coagulation assez rapide dans tous les tubes : avec la papayotine, la coagulation de la phosphoprotéine de levure se produit même avant celle de la caséine; il se forme des grumeaux qui s'agglomèrent peu à peu en une masse solide.

L'expérience est répétée avec des solutions de caséine, de phosphoprotéine de levure et de vitelline dans de l'eau de chaux saturée. Ces solutions sont à 2 ou 3 pour 100 avec les deux premières ; pour la vitelline, moins soluble, la solution est saturée de ce corps. On neutralise au moyen d'acide phosphorique :

Pour la caséine, jusqu'à virage au rose du rouge neutre ($p_{\text{H}} = 7,0$) ;

Pour la protéine de levure, jusqu'au début de virage du rouge neutre ;

Pour la vitelline, jusqu'au voisinage de la neutralité à la naphtolphthaléine.

On ajoute à 10 cent. cubes des solutions, soit 1 cent. cube de présure Hansen, soit 1 cent. cube de papayotine Merck (comme plus haut) et on place au bain-marie à 42°; après une demi-heure on a les résultats suivants :

Présure HANSEN

Papayotine

Caséine	Coagulation.	Coagulation nette.
Protéine de levure . .	Coagulat. incomplète.	Coagule en grumeaux.
Ovovitelline	Léger précipité.	Précipité un peu aggloméré.

Il est à noter que l'ovovitelline ne coagule pas avec la présure animale; Gerber a montré que le jaune d'œuf coagule sous l'action de certaines présures végétales (1).

Il est indubitable que la phosphoprotéine de levure coagule en grumeaux sous l'action de la présure. C'est vraisemblablement ce phénomène qui a été observé dans le suc de levure de presse par Geret et Hahn (2) lorsque ce suc est abandonné à l'étuve à 37° et qui est décrit dans les termes suivants par Hahn : « Déjà après deux heures il y a une forte coagulation, en partie formée de globuline et de nucléine, *presque analogue à l'action du lait sur le lait*, qui se dépose bientôt. Ce coagulum se dissout presque totalement dans le chlorure de sodium à 10 p. 100 et dans le carbonate de sodium à 10 pour 100 » (3).

D'après cette description, on ne peut guère douter qu'il ne s'agisse de la phosphoprotéine que j'ai isolée.

Le même phénomène a dû intervenir dans l'expérience de Wroblewski, lequel, dialysant du suc de levure, a obtenu des flocons volumineux, solubles dans le chlorure de sodium à 10 p. 100, qu'il croit être une globubine (4); il est bien probable qu'il s'agit d'une coagulation par la présure du suc de levure, comme dans l'observation de Geret et Hahn.

PRÉSURE DE LA LEVURE. — La présure existe dans la levure, comme l'a démontré Boullanger (5) en ensemencant directement le lait avec la levure : la coagulation est complète après deux mois seulement, ce qui indique que cette présure diffuse très lentement. Dans le suc de levure, il est difficile de la mettre en évidence en faisant agir ce suc sur une solution de phosphoprotéine, car la digestion sous l'action de la tryptase inter-

(1) GERBER. *C. R. Soc. de Biol.*, 1913, **74**, p. 53.

(2) GERET et HAHN. *Ber. deuts. chem. Gesell.*, 1898, **31**, p. 202.

(3) *Die Zymasegährung*, 2^e partie, p. 293.

(4) WROBLEWSKI. *Loc. cit.*

(5) BOULLANGER, *Ces Annales*, 1897, **11**, p. 720.

vient souvent avant que la coagulation apparaisse; on y arrive un peu plus commodément en faisant agir le suc de levure sur du lait.

Pour montrer l'existence de la présure, j'ai utilisé comparativement les trois méthodes suivantes :

a) Celle de Morgenroth (1), dans laquelle le liquide étudié est laissé en contact avec le lait, à la glacière, pendant vingt-quatre heures, avant d'être chauffé à 37°;

b) Celle de Blum et Fuld (2), qui opèrent le contact à la température ordinaire et chauffent ensuite comme le fait Morgenroth;

c) Enfin, le procédé ordinaire, où le mélange est aussitôt porté à 37°-40° et maintenu à cette température jusqu'à coagulation.

Dans aucun cas, les mélanges faits avec 0 c. c. 1, 0 c. c. 2, 0 c. c. 5 et 1 cent. cube de suc de levure pour 10 cent. cubes de lait n'ont montré de coagulation, même après plusieurs heures à 37°. Un mélange fait avec 2 cent. cubes de suc pour 10 cent. cubes de lait donne après quatre heures, par la méthode à chaud, un coagulum en grumeaux volumineux, mais sans prise en masse; ce mélange ne donne rien par les méthodes à froid.

Il fallait donc employer des proportions élevées de suc de levure.

Avec des doses de 2 à 5 cent. cubes de suc pour 10 cent. de lait, j'ai pu obtenir régulièrement la coagulation. Les mélanges étaient amenés à un égal volume (15 cent. cubes) avec de l'eau et placés aussitôt dans un bain-marie réglé à 38° avec des tubes témoins.

Voici les résultats obtenus :

Doses de suc de levure . . .	2 c.c.	3 c.c.	4 c.c.	5 c.c.
Temps de coagulation . . .	4 h. 15	3 h. 30	2 h. 20	1 h. 45

Dans les deux derniers tubes, le liquide devenait très visqueux avant de se prendre en masse. Les tubes témoins n'ont montré aucune tendance à la coagulation.

(1) MORGENTH. *Centralbl. f. Bakter.*, 1899, 26, p. 349. Voir aussi FULD. *Bioch. Zeitsch.*, 1907, 4, p. 54.

(2) L. BLUM et E. FULD. *Berlin. klin. Woch.*, 1905, no 44.

L'existence d'une présure, à la vérité peu active, me semble donc démontrée dans le suc de levure préparé par le procédé de Lebedew.

* * *

Les rapports entre la caséine, la phosphoprotéine de levure et l'ovovitelline sont résumés dans le tableau suivant :

	Caséine du lait.	Phosphoprotéine de levure	Vitelline de l'œuf
Solubilité dans l'eau . . .	Insoluble.	Insoluble.	Insoluble.
— NaCl à 10 p.100	Presque insoluble.	Peu soluble.	Très soluble.
— l'eau de chaux .	Très soluble.	Assez soluble.	Très peu soluble.
Valeur de p_H au début de la précipitation . . .	4,2 — 6,3	6,3 — 6,8	8,3 — 8,5
Coagulation par la pressure	Complète.	Incomplète.	Nulle.

Le produit obtenu par précipitation acétique des macérations de levure a donc bien sa place entre la caséine et la vitelline, mais plus près de la première.

Son caractère de protéine phosphorée est encore affirmé par l'expérience suivante :

On dissout 5 grammes de produit (séché à 37° dans le vide sulfurique) dans 500 cent. cubes de soude à 10 p. 100 et on abandonne à l'étuve à 37°. Après quarante-huit heures, on prélève 100 cent. cubes de liquide dans lequel on dose le phosphore minéral. Pour cela, on acidule par l'acide acétique et on porte à l'ébullition. On filtre, on lave le précipité et dans les liqueurs réunies, additionnées d'acide citrique, on précipite l'acide phosphorique à la manière habituelle.

On obtient 0 gr. 022 de pyrophosphate magnésien correspondant à 0 gr. 03066 de phosphore pour la totalité du liquide. Comme le produit contenait 10,01 p. 100 d'eau, on peut calculer d'après sa teneur en phosphore de 4,835 p. 100 que la préparation renfermait en tout 0 gr. 08257 de phosphore. Il est donc passé en solution, sous l'action de la soude, et à l'état minéral, 37,1 p. 100 du phosphore total.

Après cinq jours, on obtient avec 100 cent. cubes de liquide prélevé un poids de 0 gr. 0345 de $P_2O_7Mg^2$, soit en tout 0 gr. 04808 de phosphore minéral. L'action de la soude a solubilisé 58,2 p. 100 du phosphore total.

Après neuf jours, 100 cent. cubes de liquide donnent 0 gr. 039 de $P_2O_7Mg^2$, correspondant à 0 gr. 05435 de phosphore pour la totalité de la solution, soit une proportion de 65,8 p. 100 du phosphore total solubilisé à l'état minéral.

Ce phénomène de la transformation progressive du phos-

phore des phosphoprotéines en phosphore minéral sous l'action de la soude étendue, signalé et étudié par Plimber et Scott (1) pour la caséine et la vitelline, se retrouve donc avec le produit que j'ai extrait des macérations de levure.

Je propose de donner à cette protéine phosphorée le nom de *Zymocaséine* (de ζυμη, levain), sous lequel je la désignerai désormais (2).

Etude du coagulum fourni par chauffage.

Le liquide dont on a séparé la zymocaséine par l'acide acétique donne par chauffage un abondant coagulum, blanc, compact, semblable à l'ovalbumine obtenue par coagulation.

Ce corps peut être également obtenu par précipitation au moyen de sulfate d'ammonium, employé à saturation. On recueille le précipité par centrifugation et on le lave avec une solution saturée de sulfate d'ammonium. On peut le débarrasser de ce sel par dialyse dans un sac de collodium.

C'est une substance blanche, soluble dans l'eau, non précipitable par l'acide acétique, ni par le sulfate de magnésium saturé ou le sulfate d'ammonium à demi-saturation. Elle présente donc les caractères des albumines.

La solution neutre ou légèrement acide commence à se troubler à 39-40° et donne à 41° un coagulum assez léger, mais très net (3). Si on filtre, on a un liquide limpide qui se trouble de nouveau à 49° et coagule en partie à 50°. Après filtration, on a un liquide clair donnant une coagulation très abondante à

(1) PLIMMER et SCOTT. *Journ. of the chem. Society*, 1908, **93**, p. 1699.

(2) Il peut être intéressant de rappeler que Schlossberger (*loc. cit.*), en traitant la levure par la potasse étendue, et précipitant la solution obtenu par l'acide sulfurique, avait préparé un corps vraisemblablement de nature protéique, contenant environ 14 p. 100 d'azote, qu'il avait comparé à une variété de caséine. S'agissait-il de zymocaséine plus ou moins altérée ? Je n'oserais l'affirmer ; en tout cas, on pourrait risquer la même hypothèse avec plus de vraisemblance au sujet du corps isolé par Béchamp (*C. R. Acad. des Sciences*, 1874, **78**, p. 645), des produits de l'autolyse de la levure en présence de phénol : cette substance, dit-il « est bien différente de l'albumine des œufs ; c'est de la caséine qu'elle se rapproche le plus ; comme celle-ci, elle se dissout aisément dans le carbonate de sodium après sa coagulation, ce que ne fait pas l'albumine coagulée ; elle est précipitée de cette solution par l'acide acétique ».

(3) Ce fait a été d'abord signalé par E. Buchner, qui a constaté que le suc de levure se coagule déjà à 40° (*Die Zymasegärung*, p. 292).

partir de 55° jusqu'à 58°. Le liquide donne encore un léger coagulum à 61°, puis reste limpide jusqu'à 68°; on a enfin une légère coagulation de 68° à 70°. Il ne se produit plus de trouble ensuite jusqu'à 98°. Pratiquement, si on ne procède pas par fractionnement, la coagulation paraît se poursuivre de 40° à 70°.

En étudiant le suc de levure de presse, Wroblewski (1) avait déjà signalé ces coagulations successives. Il les attribuait à une série de protéines distinctes, coagulant chacune pour son compte, à 41°, 51°, 56°, 59°, 62° et 68°. La première, d'après lui, pouvait être coagulée et séparée par agitation avec de l'éther dès la température de 35° ou être précipitée par l'acide acétique. Il ne m'a pas été possible de vérifier cette dernière assertion : la précipitation acétique du suc de levure sépare en effet la zymocaséine, qui n'est pas coagulable par la chaleur : l'albumine restante commence à coaguler dès 41° si on a opéré assez vite pour éviter l'autolyse, ou si, comme je l'ai fait, on procède à toute la série des opérations dans une pièce dont la température reste comprise entre 2° et 3°. Ainsi que l'a remarqué Wroblewski, l'action de l'endotryptase a pour effet de supprimer les coagulations successives en élevant en quelque sorte la température de coagulation. Dans les idées de cet auteur, le ferment digestif attaquerait d'abord la protéine coagulant à 41°, puis celle qui coagule à 51° et ainsi de suite.

Il ne me paraît pas possible d'admettre cette manière de voir ni cette multiplicité de protéines qui seraient caractérisées seulement par leurs températures de coagulation. Ainsi que je l'ai déjà indiqué, je n'ai pu obtenir de globuline par précipitation du suc de levure au moyen du sulfate d'ammonium à demi-saturation, mais seulement la même substance que par la précipitation acétique, c'est-à-dire la zymocaséine ; or, d'après Wroblewski, la protéine coagulant à 41° est précipitée par l'acide acétique, tandis qu'elle ne l'est pas avec une concentration de sulfate d'ammonium correspondant aux 2/3 de la saturation. Il y a là une contradiction qui s'explique peut-être par l'intervention, dans les expériences de Wroblewski, des fermentautolytiques si actifs du suc de levure.

(1) WROBLEWSKI. *Loc. cit.*

Quant aux coagulations successives de l'albumine de levure, elles peuvent, à mon avis, être dues simplement à des différences d'état physique ou, si l'on veut, de grosseur micellaire. L'endotryptase fait disparaître d'abord les points de coagulation les plus bas, parce qu'elle commence par modifier l'état des particules d'albumine avant de procéder à des ruptures profondes de l'édifice moléculaire. Cette modification se traduirait donc par une élévation du point de coagulation. Il n'y a rien de surprenant, étant données les conditions dans lesquelles est obtenue cette albumine de levure, qu'elle renferme toujours un mélange de particules à divers états d'agrégation ; les diastases cellulaires, en effet, agissent sur elle à partir du moment où la cellule rompue est mise en contact avec l'eau de la macération (1).

Nous connaissons d'ailleurs un cas assez analogue : la leucosine du blé, qui est également une albumine, donne des solutions qui se troublent entre 48° et 50° et laissent séparer un coagulum à 52°. Le liquide chauffé jusqu'à 65° montre une nouvelle coagulation avec précipité se séparant à 73° jusqu'à la température de 82° (2).

Il est intéressant de rapprocher des données qui viennent d'être signalées les faits relatifs à la température mortelle de la levure. Les déterminations de E. Kayser (3) dont la précision est indiscutable, montrent que cette température mortelle, pour les levures à l'état humide, est d'environ 55°, certaines levures périssant entre 50° et 55°, d'autres seulement à 65°. D'autre part, la fermentation cesse à peu près de se produire à partir de 40° ; en élévant lentement la température, on peut cependant l'observer encore, quoique faiblement jusqu'à 45°.

La fermentation cesse donc lorsque la coagulation des albumines du protoplasma commence ; mais la mort n'arrive que si la température s'élève jusqu'à 55°, sans doute parce que la

(1) Je signalerai, à propos des températures de coagulation, que Henry et Auld, avec le suc de presse, ont obtenu des températures différentes de celles de Wroblewski : pour eux, la coagulation commence seulement à 48°, puis a lieu à 55°, 58° et 66° (*Proc. Royal Society*, 1905, **76**, série B, p. 568). En opérant avec le suc de macération de Lebedew, j'ai obtenu la même série de températures que Wroblewski.

(2) OSBORNE, *The vegetable Proteins*, London, 1916, p. 45.

(3) E. KAYSER. *Ces Annales*, 1889, 3, p. 513.

coagulation n'est définitive qu'à partir de ce point : en dessous de cette température, la cellule est encore capable de modifier l'état d'agrégation de ses protéines, créé artificiellement par le chauffage, pour le ramener au point qui lui convient.

* * *

Passons maintenant à l'étude de la composition élémentaire de la protéine coagulable.

DOSAGE DE L'AZOTE. — Il a été fait comme précédemment par la méthode de Kjeldahl.

I. 0 gr. 205 de substance exigent	12 c.c. 0	SO_4H_2 n/5, soit	16,39	p. 10 N.
II. 0 gr. 189	—	—	11 c.c. 0	—

DOSAGE DU SOUFRE. — La substance est traitée par l'acide nitrique bouillant, la masse neutralisée par le carbonate de sodium, etc., comme plus haut.

I. 1 gr. 0065 de substance donnent	0 gr. 069	BaSO_4 , soit	0,94	p. 100 S.
II. 1 gr. 205	—	—	0 gr. 078	—

DOSAGE DU PHOSPHORE. — Un poids de 0 gr. 4155 de substance, fondu avec un mélange de carbonate et de nitrate alcalins, a donné par précipitation un dépôt à peine sensible de phosphate ammoniaco-magnésien impossible à peser..

Un second échantillon, pesant 2 gr. 470, est traité par l'acide nitrique bouillant; après neutralisation par le carbonate de sodium, on évapore, on chauffe au rouge, on reprend par l'acide nitrique étendu et on filtre. Le charbon étant détruit et les liqueurs réunies évaporées à environ 100 cent. cubes, on ajoute 60 cent. cubes de solution de nitrate d'ammonium à 34 p. 100 et 6 cent. cubes d'acide nitrique pur. On chauffe et on précipite par 200 cent. cubes de molybdate d'ammonium à 3 p. 100. Le précipité jaune recueilli et lavé est dissous dans un excès d'ammoniaque; on neutralise par l'acide chlorhydrique, on ajoute 1 gramme d'acide citrique et 5 cent. cubes de solution de chlorure de magnésium à 10 p. 100 puis un excès d'ammoniaque. Le liquide ne se trouble qu'après un certain temps d'agitation. Après 24 heures, le précipité est

recueilli et donne 0 gr. 0061 de pyrophosphate de magnésium correspondant à 0,069 p. 100 de phosphore.

Cette quantité reste très minime et la teneur certainement plus faible encore du premier échantillon analysé laisse supposer que le phosphore ne s'y trouve que d'une façon accidentelle; sa présence ne doit être attribuée qu'aux difficultés d'une purification complète du produit soumis à l'analyse.

DOSAGE DES CENDRES. — Le produit a été incinéré au four à moufle à une température voisine du rouge naissant.

I. 1 gr. 9455 de substance donnent	0 gr. 0070 de cendres, soit	0,53 p. 100
II. 1 gr. 3880	—	0,29 —

Les cendres sont alcalines et contiennent des carbonates alcalins.

L'albumine de levure donne les réactions de précipitation des protéiques, en particulier avec les réactifs alcaloïdiques et les acides minéraux, y compris l'acide métaphosphorique. Ce dernier paraît donner une combinaison définie contenant près de 3 p. 100 de phosphore, analogue aux combinaisons du même genre étudiées par E. Fuld (1).

Cette protéine donne également les réactions colorées usuelles : biuret, Millon, xanthoprotéique, avec intensité. La réaction glyoxylique est particulièrement intense. Celle de Liebermann se produit facilement en rouge violacé et celle de Molisch en rouge brun. Enfin, la réaction du soufre est nettement positive.

Il s'agit donc bien d'une substance du groupe des albumines. Sa présence en quantité importante dans la levure présente un grand intérêt. Par analogie avec les appellations utilisées actuellement pour les protéines végétales, je propose de désigner ce corps sous le nom de *cérévisine* (de *Sacch. cerevisiae*, nom donné à la levure de bière par Meyen et Reess).

Origine des protéiques de la levure.

Avant de continuer l'étude de ces protéiques, il est nécessaire de savoir d'où ils proviennent et s'ils peuvent être regardés

(1) E. FULD. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1902, 2, p. 155.

comme des constituants normaux du protoplasma de la levure. En effet, ces substances sont extraites dans des conditions qui les exposent à être altérées par l'action des fermentes autolytiques et en particulier de l'endotryptase.

Examinons point par point la méthode de préparation. La levure est d'abord lavée et elle perd dans ces conditions une partie de ses matériaux azotés solubles, comme en témoigne la diminution bien connue de sa teneur en azote total. Mais ce processus ne va pas jusqu'à l'épuisement complet, jusqu'à la mort de la cellule, qui reste parfaitement capable de vivre et de se reproduire après ce lavage : son protoplasma, dans ses constituants essentiels, n'est donc pas altéré. Le séchage, qui suit le lavage et l'expression à la presse, agit beaucoup plus énergiquement sur la levure. En effet, après dessiccation dans les conditions indiquées par Lebedew, on trouve un grand nombre de cellules dont l'enveloppe s'est rompue, comme l'ont constaté Beijerinck et van Hest (1). La macération qui intervient ensuite n'augmente pas le nombre de ces cellules ouvertes, d'après les mêmes auteurs ; mais cette macération a pour effet de mélanger à l'eau le protoplasma ainsi mis en contact avec le dissolvant. Dans ces conditions, on pouvait penser que les processus autolytiques, se produisant avec énergie, viennent simplifier, solubiliser les constituants protoplasmiques, de sorte que les protéiques présents dans la macération et que j'ai isolés ne seraient que des produits d'autolyse et n'auraient aucune existence réelle dans la cellule.

La méthode de Lebedew pour l'extraction d'un suc de levure riche à la fois en protéiques et en zymase présente l'avantage d'une simplicité et d'une commodité remarquables, en même temps qu'elle nécessite seulement un matériel d'usage courant et peu coûteux. Diffère-t-elle profondément, quant à ses résultats, de celle de Buchner-Hahn ? Il ne le semble pas si on se reporte au travail cité plus haut de Beijerinck et van Hest. D'après ces auteurs, la levure préparée selon la méthode de Lebedew, c'est à dire lavée et séchée, renferme un grand nombre de cellules déchirées et l'activité du suc obtenu est proportionnelle au nombre de cellules dont la paroi est rompue,

(1) BEIJERINCK et VAN HEST. *Folia microbiologica*, 1916, 4, p. 107.

comme dans la méthode de Buchner-Hahn. Par conséquent, dans les deux cas, il s'agit de produire la rupture de la paroi cellulaire : Lebedew extrait ensuite le suc par macération aqueuse, tandis que Buchner et Hahn emploient l'expression. Les sucs de levure obtenus par les deux méthodes sont comparables et les résultats trouvés pour l'un valent pour l'autre. Or, Geret et Hahn (1) font remarquer que l'autolyse n'agit presque pas sur le suc concentré et que celui-ci ne se modifie presque plus s'il est évaporé dans le vide au tiers de son volume. D'autre part, l'endotryptase est fortement gênée par la neutralisation du liquide et n'agit plus en milieu alcalin.

Dans les macérations en milieu alcalinisé par le carbonate de sodium, telles que je les ai employées, il ne peut donc guère se produire d'attaque des protéiques présents dans la cellule. Il est par suite extrêmement probable que la zymocaséine est une phosphoprotéine existant dans le protoplasma et non un produit d'altération.

Lorsque ce corps a été précipité par l'acide acétique, l'endotryptase se trouve dans des conditions très favorables pour agir sur l'albumine restée en solution ; aussi convient-il, comme je l'ai indiqué, d'opérer rapidement et de porter aussitôt à l'ébullition pour détruire la diastase protéolytique et coaguler la cérévisine. On peut en somme, jusqu'à preuve du contraire, admettre également que cette dernière existe dans la cellule de levure.

Néanmoins, me rappelant que Buchner a tenté de préparer le suc de levure par congélation de celle-ci avec la neige carbonique et broyage au mortier, j'ai essayé d'obtenir par ce procédé un suc riche en protéiques. Dans ce but, j'ai utilisé l'air liquide (2).

On introduisait dans un grand mortier 100 grammes de levure pressée du commerce de préparation récente ; l'introduction avait lieu par portions assez petites, qui étaient aussitôt congelées avec de l'air liquide et triturées énergiquement. On continuait de faire arriver l'air liquide, par toutes petites fractions, la trituration étant poursuivie pendant vingt minutes. La poudre obtenue était abandonnée à un réchauffement progressif ; lorsqu'elle com-

(1) GERET et HAHN. *Ber. der deutsch. chem. Gesell.*, 1898, 31, p. 2335.

(2) BUCHNER avait d'abord employé l'air liquide ; il y a renoncé par la suite, l'évaporation de ce liquide pouvant laisser un résidu d'oxygène avec lequel des explosions sont possibles (*Die Zymasegährung*, p. 67).

mençait à devenir pâteuse, on la délayait dans 20 cent. cubes d'eau refroidie à 4-2°, et on essorait vivement dans un entonnoir de Buchner bien refroidi garni d'un disque de papier Chardin, le liquide étant recueilli dans un vase entouré de glace pilée. Après environ quarante minutes, on a recueilli 30 cent. cubes d'un liquide jaune clair, visqueux, opalescent, qui coagule en masse par chauffage à l'ébullition.

Ce liquide précipite par addition ménagée d'acide acétique; le précipité recueilli en quelques minutes par la centrifugation présente tous les caractères de la zymocaséine. D'autre part, deux portions du liquide obtenu, additionnées, l'une de pressure, l'autre de papayotine, dans les conditions de l'expérience déjà rapportée, donnent un coagulum abondant après deux heures de séjour à 38°.

Le liquide clair obtenu après centrifugation du précipité acétique commence à se troubler dès qu'on le chauffe à 39-40°; à 41°, il se forme un précipité très apparent. Après filtration, le liquide coagule de nouveau à 50°. Chauffé à l'ébullition, il donne un coagulum abondant identique à l'albumine de levure ou cérévisine isolée des macérations.

Comme on le voit, la zymocaséine et la cérévisine existent dans le suc de levure préparé par congélation et mis à l'abri des transformations autolytiques; on est donc en droit d'admettre que ces substances préexistent dans la levure vivante.

Est-il possible de préciser davantage et d'attribuer à chacune de ces substances une signification physiologique déterminée? Pour la cérévisine, il est bien probable que cette albumine représente un constituant important du protoplasma proprement dit des cellules de levure. Quant à la zymocaséine, est-elle aussi un constituant normal du protoplasma ou s'agit-il d'une substance de réserve pouvant disparaître ou augmenter suivant les conditions de la nutrition?

D'après les idées de Pfeffer, on pourrait admettre la première hypothèse. Pour ce physiologiste, en effet, « les corps plastiques qui semblent jouer, en général, un rôle prépondérant dans la constitution du cytoplasme doivent être regardés comme des nucléines pauvres en acide phosphorique (1). Il nous faut évidemment rectifier cette dernière assertion: les corps dont il s'agit sont des phosphoprotéines, comme ces substances

(1) W. PFEFFER. *Physiologie végétale*, trad. Friedel, 1905, 4, p. 56.

signalées par divers auteurs et rangées par eux à côté de la vitelline (ainsi par exemple, Reinke (1), dans son analyse du plasmode d'*Aethalium septicum*, y indique la présence de 5 p. 100 de vitelline).

La zymocaséine peut aussi n'être qu'un produit de réserve accumulé par la cellule. On sait que la levure renferme des inclusions ou corpuscules métachromatiques analogues à ceux qui ont été trouvés par Babes (2) dans le bacille diphtérique et aussi aux grains rouges de Butschli. Guilliermond, qui a surtout attiré l'attention sur les corpuscules métachromatiques de la levure (3), les regarde comme des substances de réserve. Je me suis demandé si la zymocaséine ne provenait pas de ces inclusions. Leur nature chimique ne paraît pas en effet bien déterminée : dans son travail de 1902, Guilliermond incline à penser qu'il ne s'agit pas de protéines, parce que le réactif de Millon ne les colore pas. Plus tard, il est cependant amené à affirmer leur nature de corps azotés (4), se basant sur les travaux de A. Meyer (5) et de Kohl (6). Ces auteurs les considèrent comme des dérivés de l'acide nucléique, mais comme le fait avec juste raison remarquer Guilliermond, ce n'est là qu'une simple hypothèse qui attend une démonstration formelle.

Le caractère le plus net des corpuscules métachromatiques est de donner après fixation une coloration élective avec le bleu de méthylène et le bleu de toluidine ; la teinte obtenue varie du rouge au violet. Avec l'hémapoxyline ou l'hématéine, ils donnent une coloration d'un rouge vineux.

Ils se colorent par la fuchsine de Ziehl et la coloration ne disparaît pas sous l'action de l'acide sulfurique à 1 p. 100 ; ce même réactif n'a pas non plus d'action sur la coloration donnée par le bleu de méthylène (7).

J'ai essayé de reproduire ces colorations sur la zymocaséine, étalée en couche mince sur lame et fixée au formol. Dans ces

(1) REINKE. *Unters. a. d. bot. Laborat.* in *Göttingen*, 1881, 2, p. 54.

(2) BABES. *Zeitsch. f. Hygiene*, 1888, 5; 1895, 20, p. 412.

(3) GUILLIERMOND. *Thèse de Paris et Lyon*, 1902.

(4) GUILLIERMOND. *Les levures* (Enc. scientif.), Paris, 1912, p. 76.

(5) A. MEYER. *Botan. Zeitung*, 1904, 62, p. 143.

(6) KOHL. *Die Hefepilze*, Leipzig, 1908.

(7) GUILLIERMOND et MAWAS. *C. R. Soc. de Biol.*, 64, p. 307; GUILLIERMOND et BEAUVIERIE. *Ibid.*, 1908, p. 482.

conditions, le bleu de méthylène donne une teinte bleue, à peine mélangée de violet ; le bleu de toluidine, du violet bleu, sans tendance marquée vers le rouge. Comme coloranthématoxylique, j'ai employé l'hémalun acide d'Ehrlich, qui m'a donné une teinte rouge vineux en milieu acide, virant au violet rougeâtre par passage dans l'eau calcaire.

La fuchsine de Ziehl colore intensément en rouge, et la teinte ne disparaît pas par l'acide sulfurique à 1 p. 100. Ce dernier atténue la couleur bleue produite par le bleu de méthylène, mais sans la faire disparaître.

Il est évidemment impossible de tirer une conclusion ferme de ces résultats, mais il faut bien remarquer qu'ils n'excluent pas l'hypothèse émise. La question appelle de nouvelles recherches. A noter que la cérévisine, soumise comparativement aux mêmes essais de coloration, se comporte comme une substance protoplasmique : elle prend avec les bleus une très légère teinte bleutée, et ne se colore pas avec l'hémalun. La zymocaséine, au contraire,吸吮 énergiquement les colorants dits basiques.

Autres essais de séparation des protéiques de la levure.

Schroeder a indiqué que la levure plasmolysée par l'éther donne un suc assez riche en protéiques. J'ai essayé de préparer par ce procédé les protéiques de levure. Dans ce but, 100 grammes de levure pressée ont été arrosés avec 10 cent. cubes d'éther pur et délayés dans une éprouvette à pied. La liquefaction est très rapide. On abandonne pendant vingt-quatre heures à la température ordinaire, puis on laisse quarante-huit heures à la glacière en présence de 800 cent. cubes d'eau thymolée. Le liquide filtré ne donne aucune coagulation par chauffage.

L'expérience est recommandée, mais après vingt-quatre heures à la température ordinaire on ajoute 500 cent. cubes d'eau thymolée, on laisse à la glacière jusqu'au lendemain, on décante et on filtre. Le liquide filtré, coloré en jaune pâle, donne un précipité par l'acide acétique ; après séparation de ce précipité, on obtient par chauffage un coagulum assez faible.

Les produits isolés sont identiques à la zymocaséine et à la

cérévisine, mais les rendements sont de beaucoup inférieurs à ceux que j'ai indiqués plus haut (1).

Van Laer a signalé depuis longtemps la liquéfaction de la levure en présence de sel marin (2). J'ai essayé des mélanges de levure pressée avec du chlorure de sodium en poudre fine, dans la proportion de 2,5 p. 100, 1,5 p. 100 et 1 p. 100 ; la liquéfaction est rapide et le mélange mousse abondamment par suite de la fermentation du glycogène. Après liquéfaction totale, on ajoute de l'eau et on laisse macérer pendant vingt-quatre heures, puis on filtre. Le liquide ne donne pas de coagulation par chauffage.

L'autolyse est donc assez rapide dans ces conditions pour détruire les protéiques qui pourraient passer en solution. J'ai songé à utiliser les propriétés antiprotéolytiques de la résorcine, signalées par Palladin (3) et, pour cela, j'ai liquéfié 100 grammes de levure pressée au moyen de 5 grammes de chlorure de sodium pulvérisé mélangé avec 2 grammes de résorcine. La liquéfaction se produit aussitôt. Après séjour de vingt-quatre heures à la glacière, la masse est délayée dans 500 cent. cubes d'eau ; on laisse déposer, on filtre. Le liquide clair ne se trouble ni par addition d'acide acétique, ni par chauffage à l'ébullition.

Une série d'expériences analogues, qu'il est inutile de rapporter en détail, dans lesquelles les conditions de durée, de concentration et de température ont été variées, n'a également donné aucun résultat.

J'ai alors essayé d'utiliser le pouvoir dissolvant de l'urée pour amener le passage des protéiques à travers la membrane de la levure. Des mélanges de 20 grammes de levure pressée avec 50 cent. cubes de solutions d'urée respectivement à 1 p. 100, 5 p. 100 et 10 p. 100 ont été préparés et abandonnés pendant quinze heures à la température ordinaire (17°). Par filtration, on obtient un liquide clair, devenant louche par chauffage à l'ébullition ; ce louche s'accentue par addition de quelques gouttes d'acide trichloracétique.

(1) Je ferai observer que Schröder n'a pas cherché à séparer les substances contenues dans la macération qu'il obtient ; il utilise uniquement le produit global.

(2) VAN LAER. *Chem. Centralbl.*, 1901, **1**, p. 352.

(3) PALLADIN. *Bioch. Zeitsch.*, 1912, **44**, p. 318.

L'expérience est recommencée avec les mêmes quantités d'urée, mais les macérations sont placées à l'étuve à 35° pendant seize heures. Le liquide obtenu par filtration du mélange contenant 1 p. 100 d'urée précipite légèrement par ébullition. Comme on le voit, les résultats sont assez peu encourageants ; la quantité d'urée nécessaire rendrait au surplus le procédé coûteux et inapplicable.

J'ajouterais que si on mélange directement de la levure pressée avec 1 p. 100 de son poids d'urée pulvérisée, il y a liquéfaction très rapide. Au bout d'une heure, la masse additionnée d'eau et filtrée donne un liquide opalescent qui ne fournit aucun précipité, ni par l'acide acétique, ni par chauffage.

Il est vraisemblable que dans toutes ces expériences de plasmolyse les protéiques restent dans l'intérieur de la cellule ; il passe seulement à l'extérieur des composés azotés plus simples, résultant peut-être d'une exagération des processus autolytiques à l'intérieur de la membrane. Ces composés azotés appartiennent presque tous au groupe des acides aminés, soit mono-aminés, soit diaminés.

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE DES PRODUITS D'HYDROLYSE DE LA ZYMOCASÉINE ET DE LA CÉRÉVISINE

Les seules données qu'il soit possible de se procurer sur la constitution des protéiques extraits de la levure nous seront fournies par l'hydrolyse de ces produits. J'ai eu recours d'abord à l'hydrolyse acide.

1 Répartition de l'azote.

Pour étudier en premier lieu la répartition de l'azote dans la molécule, j'ai utilisé la méthode décrite par Hausmann (1). Elle consiste, en principe, à hydrolyser le protéique en expérience par ébullition avec un acide, neutraliser, doser l'ammonium.

(1) HAUSMANN. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1899, **27**, p. 95; 1900, **29**, 136.

niaque formée, puis séparer les acides aminés en deux groupes au moyen de l'acide phosphotungstique.

Voici le mode opératoire suivi, qui correspond à peu près à celui indiqué par Osborne et Harris (1) :

On prend environ 1 gramme de substance, préalablement séchée jusqu'à poids constant et pesée exactement et on fait bouillir pendant huit heures au réfrigérant ascendant avec 20 cent. cubes d'acide chlorhydrique concentré. Le liquide évaporé au bain-marie au tiers de son volume est neutralisé au moyen de magnésie pure calcinée ; on ajoute un excès de magnésie et on distille, afin de déplacer l'ammoniaque qui est titrée au fur et à mesure de son dégagement.

Le résidu, additionné d'acide chlorhydrique jusqu'à réaction acide, est concentré au bain-marie ; on sépare par filtration les substances humiques insolubles dans lesquelles on dose l'azote par la méthode de Kjeldahl, et le liquide filtré, amené au volume de 100 cent. cubes, est additionné de 5 cent. cubes d'acide sulfurique, puis précipité par un léger excès d'une solution d'acide phosphotungstique à 10 p. 100 dans l'acide sulfurique à 5 p. 100. Après vingt-quatre heures, on filtre, on lave avec une solution sulfurique étendue d'acide phosphotungstique, et on dose dans le précipité l'azote basique, attribuable surtout aux acides diaminés. Un dosage fait dans le liquide résiduel donne l'azote des acides mono-aminés et permet le contrôle de l'opération entière.

L'opération faite dans ces conditions donne des résultats assez comparables ainsi qu'il est facile de s'en rendre compte en pratiquant deux déterminations successives.

1^o ZYMOCASÉINE. — On utilise deux échantillons séchés dans le vide sulfurique, pulvérisés et rendus bien homogènes. On séche environ 2 grammes de chacun à 110° et on pèse deux fractions I et II. On a les résultats suivants :

	I	II
	—	—
	gr.	gr.
Poids de substance	0,958	0,943
Trouvé azote ammoniacal	0,01064	0,0105
Correspondant en p. 100 à	1,41	1,41
Trouvé azote des substances humiques	0,00623	0,00392
Correspondant en p. 100 à	0,65	0,41
Trouvé azote du précipité phosphotungstique . .	0,0413	0,0396
Soit en azote diaminé p. 100	4,31	4,20
Trouvé azote du liquide résiduel	0,0935	0,0917
Soit en azote mono-aminé p. 100	9,76	9,72

(1) OSBORNE et HARRIS. *Journ. of amer. Chem. Society*, 1903, 25, p. 323.

Il est intéressant de grouper ces chiffres en un tableau en les rapprochant de ceux qui ont été obtenus par Osborne pour la caséine (1), à l'aide d'une méthode analogue :

	ZYMOCASÉINE		ZYMOCASEINE		CASÉINE DU LAIT			
	I	II	I	II	I	II		
	p. 100 de substance	p. 100 d'azote		p. 100 de substance	p. 100 d'azote		p. 100 de substance	p. 100 d'azote
Azote ammoniacal	1,41	6,86	1,41	6,89	1,61	10,30		
— humique	0,65	4,02	0,41	2,54	0,21	1,30		
— diaminé ou basique .	4,31	26,67	4,20	26,07	3,49	22,40		
— mono-aminé	9,76	60,39	9,72	60,33	10,31	66,00		
— total déterminé.	15,83	97,94	15,44	93,83	15,62	100,00		
Au lieu de	16,16	100,00	16,11	100,00				

Comme on le voit, la différence porte surtout sur l'ammoniaque, qui est produite en plus grande quantité dans l'hydrolyse de la caséine du lait. Néanmoins, il y a une concordance assez satisfaisante : tout au plus peut-on remarquer que la caséine du lait fournit un peu moins d'azote basique que celle de la levure.

2^o CÉRÉVISINE. — Les échantillons employés provenaient de coagulums obtenus à l'ébullition, séchés à 110° et pulvérisés finement. On les débarrasse des matières étrangères solubles par épuisements répétés à l'eau bouillante. Après dessiccation à 110°, on pèse deux fractions qui sont soumises à l'hydrolyse. On a :

	I	II
	gr.	gr.
Poids de substance	1,064	1,5305
Trouvé azote ammoniacal.	0,01022	0,01456
Correspondant en p. 100 à	0,96	0,95
Trouvé azote des substances humiques.	0,00294	0,00392
Correspondant en p. 100 à	0,276	0,256

(1) OSBORNE. *The vegetable Proteins*, London, 1916, p. 57.

	I	II
Trouvé azote du précipité phosphotungstique.	0,0412	0,0598
Soit en azote diaminé p. 100	3,86	3,91
Trouvé azote du liquide restant	0,4162	0,4694
Soit en azote mono-aminé	10,90	11,05

En calculant ces résultats en p. 100 de l'azote total, je les mettrai en regard de ceux qui ont été trouvés par Osborne (*loc. cit.*) pour une albumine végétale, la léguméline des pois :

	CÉRÉVISINE		CÉRÉVISINE		LÉGUMÉLINE DE POIS	
	I	II	I	II	I	II
	p. 100 de substance	p. 100 d'azote	p. 100 de substance	p. 100 d'azote	p. 100 de substance	p. 100 d'azote
Azote ammoniacal	0,96	5,89	0,95	5,79	1,04	6,40
— humique	0,276	1,69	0,256	1,56	0,38	1,80
— diaminé ou basique.	3,86	23,69	3,91	23,73	3,45	23,90
— mono-aminé	10,92	67,03	11,05	67,42	11,33	67,90
— total déterminé . . .	16,016	98,30	16,166	98,50	16,20	100,00
Au lieu de	16,29	100,00	16,39	100,00		

La concordance est très remarquable, bien qu'il s'agisse de deux substances d'origine aussi différente : elles appartiennent toutes deux au groupe encore très restreint des albumines végétales typiques, solubles dans l'eau et coagulables par la chaleur.

Nature de l'azote basique.

Les deux substances étudiées contiennent une quantité assez élevée d'azote sous forme d'azote basique et il m'a paru intéressant d'en étudier la nature de plus près. Nous possédons, en effet, dans la méthode décrite en 1900 par Kossel et Kutscher (1) et devenue classique un procédé qui dépasse de beaucoup, au point de vue de la précision des résultats, la méthode de

(1) KOSSEL et KUTSCHER. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1900, **31**, p. 165.

E. Fischer pour la séparation et le dosage des acides monoaminés (1). En d'autres termes, il apparaît comme plus facile de caractériser les deux nouveaux protéiques par la détermination des quantités d'arginine, d'histidine et de lysine qu'ils fournissent à l'hydrolyse que par celle des acides aminés obtenue au moyen de la distillation fractionnée de leurs éthers.

La recherche a été faite en suivant exactement les données du mémoire de Kossel et Kutscher : hydrolyse sulfurique, précipitation par la baryte, enlèvement de l'histidine et de l'arginine à l'état de combinaisons argentiques et de la lysine sous forme de phosphotungstate que l'on transforme ultérieurement en picrate. Pour la séparation de l'histidine et de l'arginine, j'ai utilisé la modification de Kossel et Pringle (2) qui repose sur l'emploi du carbonate de baryum.

1^o HYDROLYSE DE LA ZYMOCASÉINE. — L'opération a porté sur 60 grammes de produit séché dans le vide à 37°, qui correspondaient à 54 grammes de substance séchée à 110° jusqu'à poids constant. L'hydrolyse a été obtenue par chauffage de huit heures avec un mélange de 180 grammes d'acide sulfurique à 66° B. et 360 grammes d'eau.

Le liquide amené au volume de 600 cent. cubes ne réduit pas la liqueur de Fehling. Un dosage d'azote indique une teneur de 8 gr. 232, soit seulement 15,24 p. 100. Après saturation presque complète de l'acide au moyen d'hydrate de baryum pulvérisé, on essore et on épouse le sulfate de baryum par l'eau bouillante. La totalité du liquide est évaporée à 500 cent. cubes ; un dosage d'azote ne donne que 7 gr. 469, soit une perte de 0 gr. 763, correspondant à 9,26 p. 100 d'azote humique entraîné par le précipité barytique.

Le dosage de l'ammoniaque, par distillation sur un léger excès de magnésie, donne 3,97 p. 100 de l'azote total sous forme d'azote ammoniacal, soit 0,605 p. 100 du protéique. Le liquide débarrassé d'ammoniaque par la magnésie, de magnésie par la baryte et de la baryte en excès par l'acide sulfurique est additionné à chaud de sulfate d'argent jusqu'à léger excès, on refroidit, on précipite par la baryte, on filtre et on essore le précipité d'arginine et d'histidine argentiques. Ce précipité décomposé donne les bases en solution ; on amène le volume à 500 cent. cubes et on dose l'azote. On trouve 2 gr. 4224, soit 25,78 p. 100 de l'azote total.

L'histidine est séparée au moyen du carbonate de baryum ; le précipité est décomposé et l'azote dosé dans la solution. Trouvé : 0 gr. 3858 d'azote, soit 4,68 p. 100 de l'azote total, correspondant à 1 gr. 424 d'histidine ou

(1) E. FISCHER. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1901, **33**, p. 151. V. aussi *Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine*, Berlin, 1906.

(2) KOSSEL et PRINGLE. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1906, **49**, p. 318.

2,63 p. 100 de zymocaséine. J'ai pu extraire à l'état de dichlorhydrate 0 gr. 998 d'histidine, ce qui correspond seulement à 1,85 p. 100.

L'arginine argentique étant précipitée par un excès de baryte est décomposée ultérieurement; la solution contient 0 gr. 623 d'azote, soit 7,56 p. 100 de l'azote total, correspondant à 1 gr. 936 d'arginine ou à 3,58 d'arginine p. 100 de zymocaséine. La quantité d'arginine isolée en fait sous forme de nitrate était seulement de 1 gr. 35, soit 2,50 p. 100 seulement.

Le liquide dont on a précipité l'histidine et l'arginine est débarrassé d'argent; un dosage d'azote y indique 4 gr. 648 d'azote, soit 56,46 p. 100 de l'azote total. On précipite par l'acide phosphotungstique; le précipité lavé est décomposé par la baryte et l'azote dosé. On trouve 1 gr. 0396 d'azote, 12,63 p. 100 de l'azote total.

Le liquide restant, contenant les acides mono-aminés, doit donc renfermer $56,46 - 12,63 = 43,83$ p. 100 de l'azote total. Si le précipité phosphotungstique ne contenait que la lysine, il y aurait de celle-ci environ 10 p. 100 de la zymocaséine. La transformation en picrate étant effectuée, on obtient seulement 5 gr. 672 de picrate cristallisé, correspondant à 2 gr. 208 de lysine ou 4,09 p. 100 de zymocaséine. Celle-ci ne représente donc que 5,14 p. 100 de l'azote total (1).

On voit qu'indépendamment de l'azote resté dans les précipités, il reste dans les liquides dont on a extrait l'histidine et l'arginine d'une part, la lysine d'autre part, des quantités importantes d'azote sous forme inconnue (2).

Néanmoins, ces résultats vont nous permettre d'établir une comparaison entre la zymocaséine et la caséine du lait, ainsi qu'avec la glutencaséine. On peut, en effet, en s'en tenant à la répartition de l'azote basique entre l'ammoniaque et les trois bases hexoniques de Kossel, obtenir le tableau suivant :

	Zymocaséine de levure	Caséinogène du lait (3)	Glutencaséine de blé (3)
Ammoniaque	0,73	2,0	4,0
Histidine	2,63	2,6	1,8
Arginine	3,58	4,8	4,7
Lysine	4,09	5,8	4,9

C'est donc surtout par la quantité d'ammoniaque fournie que les différences apparaissent. De plus, la zymocaséine se rap-

(1) Tous ces calculs ont été établis en tenant compte des quantités employées aux dosages; ils sont toujours rapportés à la totalité de la substance soumise à l'hydrolyse. Les chiffres indiqués ne nécessitent par suite aucune correction.

(2) Cet azote est probablement sous forme d'acides monoaminés; on sait déjà que le liquide duquel a été isolée la lysine renferme une partie importante de la phénylalanine formée par hydrolyse, et précipitée en même temps par l'acide phosphotungstique.

(3) ABBERHALDEN. *Lehrbuch d. physiol. Chem.*, 1914, 3^e édition, p. 400.

proche de la caséine du lait par sa teneur en lysine, tandis que la glutencaséine est beaucoup plus pauvre.

2^o HYDROLYSE DE LA CÉRÉVISINE. — Cette hydrolyse a été effectuée en chauffant 58 gr. 6 de produit séché à 110° jusqu'à poids constant avec un mélange de 180 grammes d'acide sulfurique à 66° B. et 360 grammes d'eau, à l'ébullition, pendant huit heures.

Le liquide refroidi est amené à 500 cent. cubes; on dose l'azote sur 5 cent. cubes et on obtient 9 gr. 442 d'azote, soit 16,41 p. 100 de la cérévisine. Après saturation de l'acide par l'hydrate de baryte, essorage et lavage du précipité, il ne reste plus que 8 gr. 8536 d'azote, soit une perte de 0 gr. 5884 ou 6,22 p. 100 d'azote humique en p. 100 de l'azote total. Le dosage de l'ammoniaque donne une teneur de 3,43 p. 100 de l'azote total, correspondant à 0,53 d'azote ammoniacal p. 100 de protéine.

Après séparation de l'histidine et de l'arginine à l'état de combinaisons argentiques, on décompose le précipité et on dose l'azote dans la totalité de la solution obtenue: on trouve ainsi 1 gr. 774 d'azote, soit 18,78 p. 100 de l'azote total pour le précipité renfermant les deux bases. L'histidine argentique étant de nouveau séparée au moyen du carbonate de baryum, on la met en solution et on dose l'azote: on trouve 0 gr. 32 d'azote, soit 3,39 p. 100 de l'azote total. Ce chiffre correspond à 1 gr. 184 d'histidine, soit 2,02 p. 100 de protéine. La quantité d'histidine obtenue n'a été que de 0 gr. 87.

La combinaison argentique de l'arginine est précipitée, lavée et décomposée. On dose l'azote dans la solution et on obtient, pour la totalité, 0 gr. 7474 d'azote, soit 7,91 p. 100 de l'azote total, correspondant à 2 gr. 318 d'arginine, ou 3,95 p. 100 de protéine. La quantité d'arginine obtenue à l'état de nitrate cristallisé était de 1 gr. 95.

Le liquide dont on a séparé l'histidine et l'arginine étant débarrassé d'argent et soumis au dosage de l'azote, on trouve en tout 6 gr. 9733, soit 66,44 p. 100 de l'azote total. Le précipité phosphotungstique renferme 1 gr. 352 d'azote, soit 14,32 p. 100 de l'azote total. Il y a donc pour les acides monaminés $66,44 - 14,32 = 52,12$ p. 100 de l'azote total.

Ce précipité étant décomposé, on précipite la lysine à l'état de picrate. Ce sel recueilli et séché pèse 10 gr. 752, qui correspondent à 4 gr. 186 de lysine, soit 7,14 p. 100 de protéine. L'azote correspondant est 0 gr. 8028 ou 8,50 p. 100 de l'azote total.

On peut déduire de ces divers dosages que les quantités d'histidine et d'arginine obtenus après purification des combinaisons argentiques de ces deux bases sont notablement plus faibles que celles qui paraissaient devoir être présentes d'après le dosage de l'azote dans l'ensemble du précipité argentique.

J'ai essayé, dans une deuxième hydrolyse, d'améliorer les rendements et je suis arrivé aux chiffres suivants :

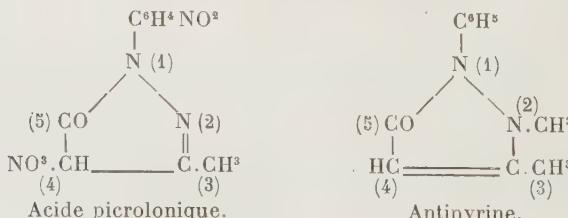
L'hydrolyse a porté sur 30 grammes de cérévisine, qui ont été chauffés pendant quatorze heures avec 90 grammes d'acide sulfurique et 180 grammes d'eau. J'ai obtenu, en azote ammoniacal, 2,634 p. 100 de l'azote total ou 0,424 p. 100 de substance. Par suite d'un accident, la fraction histidine a été perdue après sa séparation. Pour l'arginine, la combinaison argentine est décomposée, la liqueur débarrassée d'acide sulfurique par la baryte et de l'excès de baryte par un courant de gaz carbonique. On concentre, on filtre et le liquide évaporé à 10 cent. cubes environ est additionné d'un léger excès d'acide picrolonique (1) dissous dans l'alcool chaud. Après quelques instants, le liquide se trouble et il se dépose un abondant précipité cristallin jaune clair. On recueille après vingt heures, on lave, on séche et on pèse. On obtient ainsi 3 gr. 45 de picrolonate d'arginine, correspondant à 1 gr. 37 d'arginine, soit 4,42 p. 100 de protéine. Quant à la lysine, on a obtenu 6 gr. 25 de picrate de cette base, correspondant à 2 gr. 43 de lysine, soit 8,40 p. 100 de protéine (2).

On peut maintenant comparer les résultats obtenus pour la cérévisine à ceux qui ont été publiés pour d'autres albumines végétales, comme par exemple la léguméline de pois. On trouve :

	Cérévisine	Léguméline (3)
Ammoniaque	0,67	1,23
Histidine	2,02	2,27
Arginine	4,42	5,45
Lysine	8,40	3,03

Comme on le voit, la concordance dans les chiffres de répartition de l'azote obtenus par la méthode de Hausmann modifiée disparaît dès que l'on met en regard les quantités de chacune des bases elles-mêmes ou sans doute de chacun des acides aminés pris isolément.

(1) L'acide picrolonique, décrit par Bertram (*Dissertation*, Iéna, 1892), est le 1-paranitrophénol-3-méthyl-4-nitropyrazolone-5, $C^{10}H^8O^6N^4$. C'est une antipyrine dinitrée en paraphénol et en [4] et démethylée en [2].



(2) La plupart de ces résultats analytiques ont été publiés en collaboration avec M^{me} S. Kolodziejska. *C. R. Acad. des Sciences*, 1913, **157**, p. 243.

(3) OSBORNE. *The vegetable Proteins*, p. 59.

Si la léguméline est une protéine assez riche en arginine, on voit que la cérévisine est l'une des plus riches en lysine (1) qui soient connues. C'est là un caractère intéressant qui donne à cette albumine une place à part et suffit à la distinguer des autres protéines d'origine végétale.

* * *

Il est instructif de comparer, au point de vue de la répartition de l'azote, les chiffres obtenus dans l'hydrolyse sulfurique de la zymocaséine et de la cérévisine avec ceux qui ont été donnés par la méthode de Hausmann. Ces chiffres sont en p. 100 de l'azote total.

	Zymocaséine		Cérévisine	
	HAUSMANN	hydrolyse sulfurique	HAUSMANN	hydrolyse sulfurique
Azote ammoniacal	—	6,86	—	5,89
— humique	4,02	9,26	1,69	6,22
— du précipité argentique contenant arginine et histidine	»	25,78	»	18,78
— du précipité phosphotungstique	»	12,63	»	14,32
— de l'histidine	»	4,68	»	3,39
— de l'arginine	»	7,56	»	8,84
— de la lysine	»	5,14	»	9,64
— total des trois bases	26,67	17,38	23,69	21,87
— des acides monoaminés :				
directement	60,39	43,83	67,03	52,12
par différence	62,45	69,39	68,73	68,48

Il est facile de déduire de ce tableau un certain nombre de faits intéressants.

1° On voit que l'hydrolyse sulfurique produit moins d'ammoniaque et plus de substances humiques que l'hydrolyse chlorhydrique dans la méthode de Hausmann. Mais le total de l'azote ammoniacal et de l'azote humique ne change guère : 43,23 au lieu de 40,88 pour la zymocaséine, 9,65 au lieu de 7,58 pour la cérévisine. Ceci vient confirmer les faits signalés par Kossel

(1) D'après les résultats de Schroeder (*loc. cit.*), qui a extrait jusqu'à 8,68 p. 100 de lysine du mélange indéterminé, contenant vraisemblablement à la fois zymocaspine et cérévisine, qu'il a soumis à l'hydrolyse, la teneur de la cérévisine en lysine doit être encore plus élevée et comprise entre 9 et 10 p. 100, car celle de la zymocaséine ne paraît pas atteindre 5 p. 100.

et Kutscher (1) à propos de l'hydrolyse de la glutencaséine par l'acide sulfurique à 1/3 en volume ou 1/3 en poids, et par Udransky (2) au sujet de l'origine des substances humiques : celles-ci proviendraient surtout de l'action des acides sur les groupements susceptibles de fournir de l'ammoniaque par hydrolyse ;

2^o La précipitation de l'histidine et de l'arginine au moyen des sels d'argent est accompagnée par celle de produits azotés inconnus en quantité assez élevée, et il n'y a pas concordance entre les deux méthodes : on ne peut donc considérer la somme de l'azote enlevé par le précipité argentique et de l'azote enlevé ensuite par la précipitation avec l'acide phosphotungstique comme représentant l'azote basique ;

3^o Le précipité phosphotungstique qui contient la lysine renferme également d'autres corps (en particulier, comme on le sait maintenant, la phénylalanine). La détermination de l'azote basique dans la méthode de Hausmann conduit donc toujours à des résultats trop forts, et d'autant plus élevés qu'il y a plus de ces produits dans la molécule étudiée.

Nature des acides mono-aminés.

La recherche et la séparation des acides mono-aminés peuvent être faites par la méthode d'éthérification de E. Fischer, à condition de posséder une quantité assez importante de substance. J'ai dû, pour cette raison, renoncer momentanément à ce travail. Il ne faut d'ailleurs pas exagérer l'importance de cette lacune au point de vue du but poursuivi actuellement, qui est surtout de rechercher les caractéristiques les plus importantes des deux protéiques de la levure. La méthode d'éthérification, même entre des mains expertes, comporte des causes d'erreur assez importantes pour que les résultats qu'elle fournit aient beaucoup plus que la valeur d'indications sur les quantités des divers acides aminés présents dans la molécule (3).

Nous avons déjà, grâce au travail de Schröeder (*loc. cit.*), d'utiles renseignements sur certains de ces acides aminés.

(1) KOSSEL et KUTSCHER. *Loc. cit.*

(2) UDRANSKY. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1888, **42**, p. 42.

(3) ABDERHALDEN et WEIL. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1911, **74**, p. 445; 1912, **77**, p. 59.

Ainsi, nous savons que le glycocolle n'existe pas dans les protéiques étudiés, que la phénylalanine, la tyrosine et la cystine ne peuvent s'y trouver qu'en très faible quantité. Il ne faut donc probablement pas compter sur ces corps pour nous fournir des caractères différentiels.

On en peut dire autant de la leucine; présente dans toutes les molécules des protéiques en quantité assez notable, sa détermination, d'ailleurs difficile à faire exactement, ne nous apprendrait pas grand' chose.

Celle des acides aspartique et glutamique semblerait devoir être plus profitable. Il en est de même du dosage du tryptophane, élément plus particulier, tant au point de vue de sa structure chimique qu'à celui de son importance physiologique, et dont la présence imprime à la molécule protéique un caractère beaucoup plus tranché.

Pour cette raison, je me suis proposé surtout de doser cet acide aminé dans les protéiques étudiés.

DOSAGE DU TRYPTOPHANE. — Les solutions de zymocaséine, aussi bien que celles de cérévisine, donnent par addition d'une solution d'acide glyoxylique, puis d'acide chlorhydrique concentré, un anneau d'un violet intense à la surface de séparation des deux couches : c'est la preuve que ces protéiques contiennent du tryptophane (1). En raison de l'intensité de la réaction obtenue, il est à prévoir que la quantité de cet acide aminé est assez notable.

Je rappellerai le mode opératoire employé par moi pour le dosage du tryptophane dans les protéiques, par la méthode colorimétrique déjà décrite (2) :

La substance desséchée est pulvérisée finement et tamisée à travers un tissu de soie serrée, puis la poudre est séchée à l'étuve jusqu'à poids constant. On pèse exactement un poids voisin de 0 gr. 40 de produit et on le dissout, en broyant au mortier, par petites portions, dans une solution de carbonate de sodium à 0,5 p. 100. On complète ensuite à 200 cent. cubes avec cette solution. Certaines substances ne dissolvent pas complètement dans ces conditions. On prend alors une quantité convenable de préparation à l'état humide, soit coagulée par la chaleur, soit précipitée et lavée, et on l'essore avec soin. On prélève deux portions de même poids — environ

(1) ABBERHALDEN. *Lehrbuch d. physiol. Chem.*, 1914, 3^e édit., p. 380.

(2) P. THOMAS. *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1914, 1, p. 67; ces *Annales*, 1920, 34, p. 720.

2 grammes — de la masse humide et on dessèche l'une à l'étuve jusqu'à poids constant, tandis que l'autre est dissoute dans 200 cent. cubes de la solution de carbonate de sodium. On connaît ainsi le poids de matière sèche en solution.

La solution, additionnée de 0 gr. 10 d'une préparation active de pancréatine, puis de 5 cent. cubes de chloroforme et de 5 cent. cubes de toluène, est placée à l'étuve à 37° et abandonnée à cette température. On prélève après chaque période de vingt-quatre heures un volume déterminé de liquide que l'on essaie à l'eau de brome après neutralisation. Quand la coloration ne paraît plus augmenter d'intensité (cinq à sept jours) on prélève avec une pipette une certaine quantité de liquide que l'on filtre et on mesure 50 cent. cubes de filtrat auquel on ajoute 10 cent. cubes de réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde, puis assez d'acide chlorhydrique concentré et pur pour amener le volume à 100 cent. cubes. On mélange et on laisse à la lumière, en disposant à côté, soumis au même éclairement, un ballon semblable dans lequel on a mis avec le réactif et l'acide chlorhydrique 50 cent. cubes d'une solution de tryptophane pur (1) de richesse connue (0,004 à 0,010 p. 100). Après quarante à quarante-huit heures, on compare les teintes au colorimètre; on fait de nouveau cette comparaison après cinquante à soixante heures et on calcule la richesse en tryptophane.

En travaillant dans ces conditions, j'ai obtenu avec les protéiques de la levure les teneurs suivantes :

	I	II	III	Moyenne
Zymocaséine	1,64	1,40	1,50	1,51
Cérévisine.	2,20	2,14	2,50	2,28

Comme on le voit, la zymocaséine de la levure, déjà si proche de la caséine du lait par d'autres caractères, s'en rapproche encore par sa teneur très voisine en tryptophane (1,5 p. 100).

Enfin la cérévisine, avec sa teneur de 2,3 p. 100 environ, est l'une des substances protéiques les plus riches en tryptophane qui soient connues; cette richesse, jointe à la quantité élevée de lysine qu'elle donne à l'hydrolyse, suffit à la faire classer dans un groupe tout à fait à part.

Hydrolyse diastasique.

Les protéiques de la levure subissent facilement l'hydrolyse diastasique; le suc de levure lui-même contient des protéases

(1) Le tryptophane qui a servi à ces comparaisons provenait de la maison Hoffmann La Roche, place des Vosges, à Paris.

Il est commode d'en préparer une solution à 0,02 p. 100, que l'on dilue plus ou moins au moment de l'expérience.

très actives, puisque, après quelques jours de conservation à l'étuve à 37°, il ne renferme plus d'albumine coagulable, ainsi que l'ont d'abord montré Geret et Hahn. Le tableau suivant, donné par ces auteurs, indique bien la marche de la digestion (1) :

	Extrait sec	Azote total	Poids de coagulum	Azote du coagulum	Azote du liquide
Suc frais . . .	12,12	1,45	5,99	0,93	0,52
Après 1 jour . .	—	—	1,87	0,25	1,19
— 2 jours. . .	—	—	0,50	0,05	1,40
— 4 —	—	—	0,28	0,023	1,42
— 6 —	—	—	0,21	0,02	1,43

D'après eux, il s'agit d'une endotryptase qui serait accompagnée d'érepsine. Les recherches plus récentes de Dernby (2) ont montré dans le suc de levure la présence d'une peptase, d'une tryptase et d'une érepsine analogues à celles du tube digestif de l'homme. Les concentrations optima en ions hydrogène pour ces fermentes sont : $p_{\text{H}} = 4,4,5$ pour la peptase, $p_{\text{H}} = 7,0$ pour la tryptase, $p_{\text{H}} = 7,8$ pour l'érepsine.

La présence d'érepsine explique pourquoi Hahn et Geret n'ont pu trouver de peptones dans le suc de levure autolysé. Après une digestion poursuivie pendant une heure seulement, à 37°, il n'existe que des traces d'albumoses, pas de peptones, et le liquide contient déjà de faibles quantités de leucine et de tyrosine. Si on fait une digestion ralentie à la glacière, à une température de 5°, on obtient au bout de quatorze jours 0 gr. 5 seulement de deutéroalbumose pour 100 cent. cubes de suc (3). La présence de peptone aurait été constatée par Wroblewski dans le suc de levure (4), probablement par erreur.

Ce sont évidemment ces mêmes fermentes qui agissent dans l'autodigestion de la levure et qui donnent finalement toute une série d'acides aminés. Sans s'arrêter aux recherches anciennes de Béchamp (5), de Schutzenberger (6), de Nægeli et

(1) GERET et HAHN. *Die Zymasegährung*, p. 295.

(2) DERBY. *Bioch. Zeitsch.*, 1917, **81**, p. 107.

(3) GERET et HAHN. *Loc. cit.*, p. 307.

(4) WROBLEWSKI. *Loc. cit.*

(5) BÉCHAMP. *C. R. Acad. des Sciences*, 1865, **61**, p. 689 et suiv.

(6) SCHUTZENBERGER. *C. R. Acad. des Sciences*, 1874, **78**, p. 493.

Lœw (1), de Salkowski (2), etc., il faut arriver aux travaux de Kutscher (3) qui donne une liste assez complète de ces acides aminés : acide aminobutyrique, leucine, tyrosine, acides aspartique et glutamique, histidine, arginine, lysine. On y trouve aussi de l'ammoniaque, de la choline et des bases puriques, guanine et adénine surtout, xanthine et hypoxanthine à l'état de traces. Ces dernières proviennent évidemment de l'action d'une nucléase.

J'ai essayé de produire l'hydrolyse diastasique des protéiques de levure, isolés et mis à l'abri des fermentations autolytiques, au moyen de pepsine et de trypsine animales.

1^o **ZYMOCASÉINE.** — Une solution de deux grammes de zymocaséine dans 100 cent. cubes de carbonate de sodium à 0,05 p. 100 est additionnée d'acide chlorhydrique étendu jusqu'à neutralisation ; on verse alors un excès d'acide, tel que la teneur en HCl réel soit de 0,3 p. 100, puis on ajoute 0 gr. 10 de pepsine active (4) et on place au bain-marie à 45°.

Après trente minutes, le précipité, devenu d'abord translucide, a presque disparu. Au bout de deux heures, on neutralise, on filtre et on examine les réactions du liquide. Celui-ci, acidulé par l'acide acétique, ne se trouble pas par chauffage à l'ébullition. Par addition ménagée d'acide nitrique, il donne un trouble qui disparaît par un léger chauffage et reparait par refroidissement. Saturé avec du sulfate d'ammonium ou du sulfate de zinc en poudre fine, il donne un léger précipité blanc. Ce liquide contient donc des albumoses, mais en faible quantité.

La solution dont on a précipité les albumoses par le sulfate d'ammonium est filtrée et soumise à une dialyse rapide, afin d'enlever la majeure partie du sel dissous. Le liquide clair ne précipite plus par l'acide nitrique, mais donne avec l'alcool un précipité un peu visqueux ; avec le chlorure mercurique, il fournit un précipité blanc volumineux. Les réactions colorées présentent des intensités variables :

(1) NÄGELI et LÖEW. *Journ. f. prakt. Chem.*, 1878, **125**, p. 403.

(2) E. SALKOWSKI. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1889, **13**, p. 506.

(3) KUTSCHER. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1901, **32**, p. 59 et 419; 1902, **34**, p. 517. KUTSCHER et LOHMANN. *Ibid.*, 1903, **39**, p. 159 et 313.

(4) Pepsine ARMOUR, titrant 360 d'après l'essai du Codex.

Biuret.	Intense (rose violacé).
Xanthoprotéique . . .	+ faible.
MILLON	+ faible.
HOPKINS	+ nette.
LIEBERMANN	+ nette.

Il s'agit donc bien de peptone.

La solution de zymocaséine dans le carbonate de sodium, additionnée de 0 gr. 10 de trypsine commerciale (1) et soumise à la digestion au bain-marie à 45° devient tout à fait transparente et fluide au bout de peu de temps. Après deux à trois heures, le liquide ne précipite plus que faiblement par l'acide nitrique ; il montre les mêmes réactions que celui qui provient de la digestion pepsique.

2^o CÉRÉVISINE. — J'ai employé le coagulum humide obtenu par chauffage de la solution acidifiée à l'ébullition et lavage à l'eau bouillante.

Cette masse humide a été délayée dans l'acide chlorhydrique étendu contenant 0,3 p. 100 d'acide réel et placée au bain-marie à 45° après addition de 0 gr. 10 de pepsine. Le coagulum se gonfle et en quelques instants la masse entière devient gélatineuse et transparente ; la liquéfaction se produit ensuite très rapidement. Au bout de deux heures, on peut constater dans le liquide filtré et neutralisé la présence d'albumoses et de peptones, avec peut-être une proportion d'albumose plus élevée que dans le cas de la zymocaséine.

Si on ajoute à ce liquide 10 p. 100 de suc de levure Lebedew et si on l'abandonne à l'étuve à 37° après addition de toluène et de chloroforme pour en assurer la stérilité, on voit que la réaction du biuret diminue très vite d'intensité ; elle a totalement disparu au bout de trois jours.

Le coagulum humide de cérévisine, délayé dans une solution de carbonate de sodium à 0,5 p. 100, additionné de 0 gr. 10 de trypsine et placé au bain-marie à 45°, se gonfle et se dissout très rapidement. Au bout de deux à trois heures, il montre également la présence d'albumoses et de peptones.

La cérévisine séchée à 410° et pulvérisée constitue une poudre formée de particules très dures et très résistantes ; aussi

(1) Trypsine très active, provenant de MERCK.

ne se laisse-t-elle pas attaquer rapidement par les ferment digestifs. Il est nécessaire, si on emploie ce produit, de le pulvériser très finement et de tamiser la poudre obtenue, pour obtenir des digestions suffisamment avancées.

On voit en résumé qu'il est possible d'obtenir des peptones véritables avec les protéiques de la levure; c'est seulement la présence d'érepsine dans le suc de levure qui fait disparaître des peptones dans les produits d'autolyse.

QUATRIÈME PARTIE

UTILISATION DES PROTÉIQUES DE LA LEVURE

On a depuis longtemps songé à l'utilisation de la levure au point de vue alimentaire; il existe déjà dans le commerce un certain nombre de préparations, ayant surtout la forme d'extraits de viande, qui sont obtenus par divers procédés en partant de la levure.

Sans aborder la question de la nature de ces produits, en restant sur le terrain purement scientifique, on peut tirer des résultats qui ont été exposés précédemment des conclusions intéressantes au point de vue de l'utilisation des protéiques étudiés par l'organisme.

Nous devons admettre actuellement, d'après Rona (1), qu'il ne se produit dans l'organisme animal aucune transformation d'un acide aminé dans un autre, ni aucune nouvelle formation d'un acide aminé, à l'exception du glycocolle. Donc les acides aminés qui n'existent pas dans les protéiques des aliments ingérés ne se font pas dans l'organisme.

Ces acides aminés n'ont certainement pas tous la même importance, chacun pouvant jouer un rôle particulier. On entrevoit déjà ce rôle pour quelques-uns d'entre eux: on sait depuis longtemps que la gélatine, qui ne renferme ni phénylalanine, ni tyrosine, ni tryptophane, est incapable de maintenir, à elle seule, l'organisme en état d'équilibre azoté; il en est de même de la zéine, à laquelle manquent le glycocolle, la

(1) P. RONA. *Handbuch d. Bioch.* de OPPENHEIMER, Iéna 1908, 4, 1^{re} partie, p. 550.

lysine et le tryptophane. D'autre part, la gliadine du blé et l'hordéine de l'orge, auxquelles font défaut le glycocolle et la lysine, peuvent assurer le maintien de l'équilibre azoté chez l'individu adulte, mais elles ne suffisent pas pour permettre en même temps le développement de l'individu jeune, non encore arrivé au stade de développement complet. Au contraire, la caséine, la lactalbumine, l'ovalbumine, l'édestine, la gluténine (gluten-caséine), permettent aussi bien le maintien de l'équilibre que le développement (1).

Le rôle du tryptophane, en particulier, a été bien mis en évidence par Abderhalden (2). Cet auteur a prouvé qu'un animal peut être nourri complètement avec les produits d'hydrolyse des protéiques. En employant les acides aminés résultant de l'hydrolyse de la caséine, soit en entier, soit débarrassés de tryptophane, il a montré que ce dernier est un constituant indispensable à l'entretien de l'équilibre azoté et ne pouvant être remplacé.

Cette observation suggère l'idée qu'un aliment peu favorable, soit parce qu'il lui manque un ou plusieurs acides aminés indispensables, soit parce que les proportions en sont par trop différentes de celles des protéiques de notre propre organisme, peut être amélioré par addition d'un autre protéique contenant les substances qui font défaut ou rétablissant les rapports désirables entre les acides aminés. Des corps comme la zymocaséine et surtout la cérévisine, dont la richesse en lysine et en tryptophane est exceptionnelle, pourraient ainsi jouer un rôle considérable dans l'alimentation, surtout chez les individus en voie de développement, en étant simplement adjointes à des protéines végétales comme celles de l'orge ou du maïs, dans lesquelles il y a déficit de ces acides aminés indispensables. On conçoit facilement l'intérêt économique d'un pareil fait.

Je n'ai pu, faute de moyens suffisants, vérifier cette hypothèse si vraisemblable. Je me suis contenté, avec la quantité assez faible de cérévisine dont je disposais, de m'assurer que ce protéique permet de maintenir à lui seul l'équilibre azoté.

(1) OSBORNE et MENDEL. Revue américaine *Science*, 1911, 24, p. 722. Voir également divers travaux des mêmes, dans *Journ. of biol. Chem.*, 1911-1919, 10 et suivants, contenant la bibliographie.

(2) ABDERHALDEN. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1912, 77, p. 22.

L'animal en expérience était un jeune chien, non encore parvenu peut-être à son complet développement, qui a reçu pendant quelques jours une ration, copiée sur celle des expériences d'Abderhalden, formée de 50 grammes de viande de cheval, 20 grammes de graisse, 20 grammes de glucose, 20 grammes d'amidon et 5 grammes de cendres d'os. L'équilibre étant à peu près obtenu après cinq jours, l'animal a reçu dans les jours suivants une ration identique, mais dans laquelle la viande était remplacée par 57 grammes de cérévisine coagulée humide. La quantité de boisson était identique pendant la durée de l'expérience (125 gr. d'eau)

Voici les chiffres obtenus :

Jours	Poids	Régime	Azote	Urine	Azote	Poids	Azote	Azote	Bilan
			ingéré	émise	de l'urine	des fèces	des fèces	éliminé	
—	—	—	gr.	c. c.	gr.	gr.	gr.	gr.	—
1	3,260	viande	1,41	103	1,33	0,12	1,45	—0,04	
2	3,270	de	—	120	1,38	0,12	1,50	—0,09	
3	3,295	cheval	—	100	1,29	0,11	1,40	+0,01	
4	3,300	50 gr.	—	90	1,27	0,11	1,38	+0,03	
5	3,290	—	—	130	1,30	0,12	1,42	—0,04	
6	3,305	—	1,43	100	1,28	8,0	0,12	1,40	+0,03
7	3,315	cérévi-	—	110	1,33	0,12	1,45	—0,02	
8	3,320	sine	—	120	1,36	0,14	1,50	—0,07	
9	3,320	57 gr.	—	95	1,27	0,13	1,40	+0,03	
10	3,310	—	—	115	1,38	11,4	0,14	1,52	—0,09
11	3,295	—	—	100	1,30	8,13	1,48	—0,05	

L'expérience est évidemment trop courte pour être absolument démonstrative ; elle confirme néanmoins les expériences antérieures de Voeltz (1) et celles de Voeltz et Baudrexel (2), qui, en faisant ingérer de la levure en nature à des animaux, ont obtenu une utilisation des protéiques s'élevant à 86 p. 100 de la quantité contenue dans la levure absorbée. Dans l'expérience qui vient d'être rapportée, l'utilisation des protéiques de la viande étant de 91,5 p. 100, celle de la cérévisine s'est élevée jusqu'à 92,8 p. 100, ce qui s'explique peut-être par l'absence complète d'enveloppes cellulaires, de fibres, etc., la totalité du protéique ayant pu être digérée.

(1) W. WÖELTZ. *Pfügers Archiv*, 1903, 107, p. 388.

(2) W. WÖELTZ et A. BAUDREXEL. *Bioch. Zeitsch.*, 1911, 30, p. 457, 31, p. 355.

Résultats généraux et conclusions.

Voici, sommairement exposés, les principaux résultats obtenus au cours de ce travail :

1^o On peut extraire, par macération aqueuse de la levure préalablement lavée et séchée selon les données de Lebedew, deux protéiques nouveaux, dont l'un est une phosphoprotéine, l'autre étant une albumine vraie. Les rendements sont considérablement accrus si on opère en milieu faiblement alcalin à la température de 35°;

2^o Ces protéiques sont en moyenne dans le rapport de 1 du premier pour 3 du second. Ils existent dans le suc de levure de Buchner préparé soit à la manière ordinaire, soit par congélation à basse température ; on est donc en droit d'admettre leur préexistence dans la levure vivante ;

3^o La phosphoprotéine, à laquelle j'ai donné le nom de *zymocaséine*, est insoluble dans l'eau, soluble dans les alcalis et les carbonates alcalins ; elle renferme 16,45 p. 100 d'azote et 1,80 p. 100 de phosphore. Par ses propriétés, elle se place entre la caséine du lait et la vitelline de l'œuf ; elle coagule sous l'action de la présure, mais moins complètement que la caséine du lait. Dans le suc de levure, elle coagule également sous l'action d'une présure, peu active du reste, qui se trouve dans ce suc. Par ses caractères de coloration, la zymocaséine se rapproche des substances de réserve des grains d'aleurone et des corpuscules métachromatiques, sans que l'on puisse conclure à l'identité ;

4^o L'albumine de levure, que j'ai appelée *cérévisine*, est soluble dans l'eau et coagulable par la chaleur dès 41° ; elle donne plusieurs coagulations jusqu'à 70°, sans que l'on puisse parler de plusieurs substances différentes. Elle renferme 16,35 p. 100 d'azote et 0,90 p. 100 environ de soufre avec des traces de phosphore probablement accidentelles. Par ses réactions colorées, elle se comporte comme les substances protoplasmiques ;

5^o L'étude de l'hydrolyse acide de la zymocaséine confirme le rapprochement déjà fait de cette substance avec la caséine du

lait, au point de vue de la répartition de l'azote et des quantités d'histidine, arginine et lysine qu'elle renferme. Quant à la cérévisine, elle paraît assez voisine de certaines albumines végétales comme la légumeline de pois ; elle en diffère cependant par sa moindre teneur en arginine et par sa richesse en lysine, qui en fait le protéique le plus riche en lysine qui soit actuellement connu. C'est à cette albumine qu'il faut en effet rapporter le résultat déjà obtenu par Schröeder avec un mélange mal défini ;

6^o Parmi les acides mono-aminés résultant de l'hydrolyse, le plus important est le tryptophane, qui est fourni en quantité notable par les deux protéiques : la zymocaséine en contient 1,51 p. 100 et la cérévisine 2,28 p. 100. Cette dernière est actuellement l'un des protéiques les plus riches en tryptophane qui soient connues ;

7^o La teneur particulièrement élevée de la cérévisine en tryptophane et en lysine pourrait faire jouer à ce protéique un rôle important dans l'alimentation, en lui permettant de suppléer, par son mélange avec certains aliments, à l'insuffisance de ceux-ci, en acides aminés indispensables. La cérévisine est très assimilable par l'organisme animal et permet de le maintenir en équilibre azoté ;

8^o L'hydrolyse des protéiques de levure sous l'action de la pepsine et de la trypsine conduit à la formation d'albumoses et de peptones, lorsque l'on opère sur des produits isolés de la levure. L'absence de peptones habituellement constatée dans les produits d'autolyse de la levure ou dans le suc de levure est due à l'activité de l'érepsine qui s'y trouve.

D'une manière générale, il semble que les protéiques formés dans l'assimilation azotée de la levure paraissent s'éloigner par certains côtés des protéiques végétaux déjà connus et en particulier de ceux qui forment les réserves des graines.

De nouvelles recherches entreprises chez divers représentants des champignons et des bactéries montreront sans doute si les protéiques de la levure constituent les premiers types d'un nouveau groupe.

D'ores et déjà, il apparaît que l'*Aspergillus niger* renferme une phosphoprotéine, apparemment riche en tryptophane, et

une albumine coagulable, analogues aux deux protéiques extraits de la levure (4). C'est là une première et intéressante confirmation de cette hypothèse.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

ABDERHALDEN. *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, 3^e édit., Berlin, 1914.
 — Fütterungsversuche mit vollständig abgebauten Nahrungsstoffen. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1912, **77**, p. 22.

ABDERHALDEN et WEIL, Ueber die bei der Isolierung der monoaminoacids mit Hilfe der Estermethode entstehenden Verluste. *Id.*, 1911, **74**, p. 445; 1912, **77**, p. 59.

BABES, Ueber isoliert farbbare Anteile von Bacterien. *Zeitsch. f. Hygiene*, 1889, **5**, p. 173.

— Beobachtungen über die metachromatischen Körperchen. *Id.* 1895, **20**, p. 412.

BÉCHAMP, Sur l'épuisement physiologique et la vitalité de la levure de bière. *C. R. Acad. des Sciences*, 1865, **61**, p. 689.

— Nouvelles recherches sur l'épuisement physiologique de la levure de bière. *Id.*, 1874, **78**, p. 645.

BEIJERINCK et VAN HEST, Lebedeff's Hefemazerationsaft. *Folia microbiologica*, 1916, **4**, p. 107.

BLUM et FULD, Ueber eine neue Methode der Labbestimmung und über das Verhalten des menschlichen Magenabs unter normalen und pathologischen Zuständen. *Berlin. klin. Woch.*, 1905, n° 44 a.

BOKORNY, Albumin in der Hefe. *Zeitsch. f. Spiritusindustrie*, 1900, **18**, p. 33.

BOULLANGER, Action des levures de bière sur le lait. *Ces Annales*, 1897, **11**, p. 720.

E. BUCHNER, Alkoholische Gährung ohne Hefezellen. *Ber. deuts. chem. Gesell.*, 1897, **30**, p. 417.

E. BUCHNER, H. BUCHNER et M. HAHN, Die Zymasegährung, Untersuchungen über den Inhalt der Hefezellen und die biologische Seite des Gährungsproblems. Munich et Berlin, 1903.

DERNBY, Studien über die proteolytische Enzyme der Hefe und ihre Beziehung zu der Autolyse. *Bioch. Zeitsch.*, 1917, **81**, p. 107.

E. FISCHER, Ueber die Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1901, **33**, 151.

— Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine. Berlin, 1906.

E. FULD, Ueber die Verbindungen der Eiweisskörper mit Metaphosphorsäure. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1902, **2**, p. 153.]

— Zur Theorie und Technik des sogenan. Morgenroth-Versuches. *Bioch. Zeitsch.*, 1907, **4**, p. 54.

GERBER, Analogie entre la coagulation du jaune d'œuf et la caséification du lait par le latex de l'Euphorbia Characias L. *C. R. Soc. de Biol.*, 1913, **74**, p. 53.

(4) P. THOMAS et R. C. MORAN. *C. R. Acad. des Sciences*, 1914, **159**, p. 125.

GERET et HAHN, Zum Nachweis des im Hefepresssaft enthaltenen proteolytischen Enzyms. *Ber. deuts. chem. Gesel.*, 1898, **31**, p. 202.

— Weitere Mittheilungen über das im Hefepresssaft enthaltene proteolytische Enzym. *Id.*, **31**, p. 2335.

GIGLIONI, Di un metodo nuovo e semplice per separare la zimazia dal lievito di birra e per estrarre generalmente gli enzimi dai tessuti viventi. *Atti d. Società Italiana per il Progresso delle Scienze*, octobre 1911.

GUILLIERMOND, Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures à formes levures. *Thèse*, Paris et Lyon, 1902.

— Les levures. *Encyclop. scientifique*, Paris, 1921.

GUILLIERMOND et MAWAS, Caractères histochimiques des granulations des mastzellen et rapport de ces corps avec la volutine des protistes. *C. R. Soc. de Biol.*, 1908, **64**, p. 307.

GUILLIERMOND et BEAUVRIER, Caractères histochimiques des globoïdes de l'aleurone. *Id.*, p. 482.

HAUSMANN, Ueber die Verteilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1899, **27**, p. 93; 1900, **29**, p. 136.

HENRY et AULD, On the probable Existence of Emulsin in Yeast. *Proc. Royal Society*, 1905, série B, **76**, p. 568.

KAYSER, Action de la chaleur sur les levures. *Ces Annales*, 1889, **3**, p. 513. KOHL, Die Hefepilze. Leipzig, 1908.

A. KOSSEL, Ueber das Nuclein der Hefe. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1879, **3**, p. 284; 1880, **4**, p. 290 et suiv.

— Untersuchungen über die Nucleine, Strasbourg, 1881.

KOSSEL et KUTSCHER, Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1900, **31**, p. 165.

KOSSEL et PRINGLE, Ueber Protamine und Histone. *Id.*, 1906, **49**, p. 301.

KUTSCHER, Chemische Untersuchungen über die Selbstfährung der Hefe. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1902, **32**, p. 59 et 419; **34**, p. 517.

KUTSCHER et LOHMANN, Die Endprodukte der Pankreas und Hefeselbstverdauung. *Id.*, 1903, **39**, p. 159 et 313.

VAN LAER, Brevet D. R. P. 417303, 1898. *Chem. Centralbl.*, 1901, **1**, p. 382.

LEBEDEW, Extraction de la zymase par simple macération. *C. R. Acad. des Sciences*, 1911, **152**, p. 49.

A. METER, Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins. *Botan. Zeitung*, 1904, **62**, p. 113.

MORGENROTH, Ueber den Antikörper des Labenzyms. *Centralbl. f. Bakter.*, 1899, **26**, p. 349.

NÆGELI et LOËW, Ueber die chemische Zusammensetzung der Hefe. *Journ. f. prakt. Chem.*, 1878, **47**, p. 403; *Liebigs Annalen*, **103**, p. 322.

OSBORNE, The vegetable Proteins. Londres, 1916.

OSBORNE et HARRIS, Nitrogen in Protein Bodies. *Journ. of Amer. Chem. Society*, 1913, **25**, p. 323.

OSBORNE et MENDEL, Revue américaine *Science*, 1911, **34**, p. 722; *Journ. of biol. Chem.*, 1911-1919, **10** et suivants.

PALLADIN, Zur Kenntniss der gegenseitigen Abhängigkeit zwischen Eiweissabbau und Atmung der Pflanzen. *Bioch. Zeitsch.*, 1912, **44**, p. 318.

PAYEN, Sur le développement des végétaux, 3^e mémoire. *Mémoires présentés par divers savants à l'Académie des Sciences*, 1846, **9**, p. 32.

PFEFFER, Physiologie végétale, trad. Friedel. Paris, 1905.

PLIMMER et SCOTT, A reaction distinguishing Phosphoprotein from Nucleo-

protein and the Distribution of Phosphoproteins in Tissues. *Journ. of the chem. Society*, 1908, **93**, p. 1699.

REINKE et RODEWALD, Die chemische Zusammensetzung des Protoplasmas von Aethalium septicum. *Untersuchung a. d. botan. Institut d. Univers. Göttingen*, 1881, **2**, p. 54 et *Botan. Zeitung*, 1880, **38**, p. 315.

P. RONA, in Oppenheimer's Handbuch der Biochemie, Iena, 1908-1912.

SALKOWSKI, Ueber Zuckerbildung und andere Fermentationen in der Hefe. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1889, **13**, p. 506.

SCHLOSSBERGER, Ueber die Natur der Hefe, mit Rücksicht auf die Gährungserscheinungen. *Liebigs Ann. Chem. u. Pharm.*, 1844, **51**, p. 193.

SCHROEDER, Zur Kenntniss der Proteinsubstanzen der Hefe. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1902, **2**, p. 389.

SCHUTZENBERGER, Faits pour servir à l'histoire de la levure de bière. *C. R. Acad. des Sciences*, 1874, **78**, p. 493.

SEDLAYR, Beiträge zur Chemie der Hefe. *Zeitsch. f. d. ges. Brauwesen*, 1909, **26**, p. 384.

STUTZER, Vorkommen von Nuclein in der Schimmelpilze und in der Hefe. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1882, **6**, p. 572.

P. THOMAS, Sur les substances protéiques de la levure. *C. R. Acad. des Sciences*, 1913, **156**, p. 2024.

P. THOMAS et S. KOLODZIEJSKA, Les substances protéiques de la levure et leurs produits d'hydrolyse. *Id.*, 1913, **157**, p. 243.

P. THOMAS et R. C. MORAN, Les substances protéiques de l'Aspergillus niger. *C. R. Acad. Sciences*, 1914, **159**, p. 125.

P. THOMAS, Présence et dosage du tryptophane dans les matières protéiques de la levure, *Bull. Soc. Chimie biol.*, 1914, **1**, p. 67.

UDRANSKY, Ueber Furfurolreaktionen. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1888, **12**, p. 42.

VÖLTZ, Ueber den Einfluss verschiedener Eiweisskörper und einiger Derivate derselben auf den Stickstoffumsatz. *Pflügers Archiv*, 1903, **107**, p. 388.

VÖLTZ et BAUDREXEL, Die Verwertung der Hefe im menschlichen Organismus. *Bioch. Zeitsch.*, 1911, **30**, p. 457.

VOZARIK, Verfahren zur Veraschung von Nahrungsmittel und von anderen organischen Stoffen zwecks Bestimmung ihres Phosphorgehalt. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1912, **76**, p. 426.

WROBLEWSKI, Zusammensetzung des Buchner'schen Hefepresssaftes. *Ber. deuts. chem. Gesell.*, 1898, **31**, p. 3218.

Proc. amer. physiol. Society, dans *Amer. Journ. of Physiol.*, 1908, **21** (sans nom d'auteur).

LE DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE CHEZ LES BOVIDÉS AU MOYEN DE L'ANTIGÈNE DE BESREDKA

par les Drs

CH. HRUSKA (Prague) et W. PFENNINGER (Zurich).

Le diagnostic clinique de la tuberculose chez les bovidés est, en général, difficile, alors même que la maladie est déjà avancée. Aussi nous sommes-nous demandé si l'on ne saurait appliquer au diagnostic de la tuberculose bovine la méthode de fixation de l'alexine.

Dès la découverte de la réaction Bordet-Gengou il a été fait beaucoup de tentatives pour déceler des anticorps dans les sérum d'individus et d'animaux tuberculeux. Nous nous bornerons à citer ici les principaux travaux relatifs à la tuberculose des bovidés. Hennepe (1) et Jousset (2), en examinant les sérum de veaux vaccinés avec du Tauruman, du Bovovaccin et des bacilles humains, constatèrent la présence d'anticorps fixant le complément en présence des antigènes correspondants. Ruppel et Rickman (3) trouvèrent sur 60 bovidés la réaction de fixation négative 9 fois; 51 sérum leur donnèrent une réaction positive, quoique chez 25 seulement ils constatèrent la tuberculose à l'autopsie.

Weber et Dieterlen (4) affirment n'avoir pas rencontré d'anticorps dans les sérum de bovidés sains, et en avoir presque toujours trouvé chez des bovidés atteints de tuberculose spontanée ou expérimentale.

Bach (5) conclut, au contraire, de ses recherches, que les

(1) *Inaug.-Dissert.* Berne, 1909.

(2) *C. R. Soc. de Biol.*, 1909, **67**, n° 37.

(3) *Zeitsch. f. Immunitätsf.*, 1910, **6**, p. 344.

(4) *Arb. a. d. k. Gesundheitsamtes*, 1910, f. 10, p. 217.

(5) *Inaug.-Dissert.*, Leipzig, 1909.

bovidés, qu'ils soient sains, peu ou fortement atteints de tuberculose, se comportent de même au point de vue de la réaction de fixation, en présence d'une émulsion de bacilles tuberculeux, et que, par conséquent, la méthode est impropre au diagnostic. Des résultats meilleurs furent obtenus par Hammer (1); cet auteur examina 96 bovidés dont 46 tuberculeux; la réaction de fixation fut positive chez tous les animaux ayant présenté des lésions tuberculeuses et chez plusieurs non tuberculeux. Tout récemment, Borrel et Boez (2) employèrent, à titre d'antigène, de vieux bacilles humains broyés et extraits avec l'alcool. Ils examinèrent 20 sérums de bovidés tuberculeux et 60 sérums de bovidés sains; les tuberculeux leur donnèrent 80 p. 100, les bovidés sains 6 p. 100 de résultats positifs. Bang et Andersen (3) ont constaté la réaction de fixation positive chez les animaux infectés avec des bacilles acido-résistants; c'est surtout le sérum de vaches atteintes de la maladie de Johne, qui, dans leurs expériences, fixait le complément, et cela aussi fortement que le sérum de vaches tuberculeuses. Ces auteurs ont pu constater la présence des mêmes anticorps dans le lait des vaches atteintes de la tuberculose de la mamelle et de l'entérite paratuberculeuse très avancée.

TECHNIQUE.

Dans toutes nos expériences le sang était prélevé directement dans le cœur, aussitôt que l'animal était abattu. Une dissection minutieuse des organes permettait de nous rendre compte de l'étendue des lésions tuberculeuses. Nous disposions de la sorte d'un moyen de contrôle beaucoup plus précieux que celui fourni par l'examen purement clinique. Nous étions donc à même de juger exactement de la valeur diagnostique de la réaction. Les échantillons de sang centrifugés, chauffés (pendant 30' à 56°), conservés à la glacière jusqu'au lendemain, étaient utilisés deux jours après leur récolte, au plus tard. Dans la plupart des sérums nous avons observé qu'une coagulation

(1) *D. tier. Woch.*, 1912, n° 39, p. 593.

(2) *C. R. Soc. de Biol.*, 1920, 83, p. 4130.

(3) *Centralbl. f. Bakter.*, 1913, Orig. 69, p. 517.

secondaire se produisait après la centrifugation; ce phénomène se reproduisait souvent une ou deux fois et rendait parfois difficile l'obtention de sérum liquide. Ces coagulations successives s'observent aussi bien avec les sérum d'animaux tuberculeux que d'animaux sains.

La technique que nous avons suivie fut celle adoptée dans le laboratoire de M. Besredka pour l'examen des sérum humains. On prenait une dose fixe d'antigène (0,3), et on faisait varier la dose d'alexine (diluée à 1/15) (Calmette-Massol). L'alexine était titrée, au préalable, en présence de deux sérum normaux, et pour éviter toute erreur d'interprétation, aussi en présence d'antigène.

Voici le modèle de titrage de l'alexine :

Sérum normal.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antigène.	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Alexine à 1/15.	0,4	0,2	0,3	0,4	0,5
Eau physiologique. . .	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4

Après avoir laissé les tubes pendant une heure à l'étuve, on ajoute 1 cent. cube de globules rouges (5 p. 100) sensibilisés (15' avant l'emploi); on les remet à l'étuve pendant 30', après quoi on fait la lecture. Ordinairement, l'hémolyse est obtenue déjà avec 0 c. c. 2 d'alexine à 1/15; on emploie dans ce cas pour la réaction des doses croissantes, à partir de 0 c. c. 2 par exemple : 0 c. c. 2; 0 c. c. 25; 0 c. c. 3; 0 c. c. 4; 0 c. c. 5. Un tube témoin ne contenant pas d'antigène nous renseigne si le sérum à examiner est empêchant par lui-même. Nous estimons ce témoin indispensable, attendu que certains sérum normaux des bovidés sont doués d'un pouvoir inhibant très accusé.

Avant d'ajouter des globules sensibilisés, nous laissons les tubes une heure à la température du laboratoire, puis, une heure à 37° à l'étuve. Après l'addition des globules, nous portons les tubes à l'étuve pendant 40'. Il est très utile, pour la juste appréciation de la réaction, d'employer en même temps chaque fois plusieurs sérum sûrement normaux.

Nos recherches ont porté sur 90 sérum de bovidés sains et sur 304 sérum de bovidés tuberculeux, à tous les degrés de la maladie. Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus.

Nous avons établi six catégories, suivant l'étendue des lésions et les organes touchés.

	Total	Négatifs	Positifs	P. 100
				des positifs
Bovidés non tuberculeux	90	88	2	2,2
Bovidés tuberculeux	304	47	257	84,5
				P. 100
			Positifs	Négatifs
I. — <i>Tuberculose exclusivement ganglionnaire</i> (médiast., bronch., mésenter., rétrophar.).	—	—	—	—
II. — <i>Tuberculose ganglionnaire avec tuberculose discrète des poumons</i>	28	41	—	59,4
III. — <i>Tuberculose ganglionnaire, pulmonaire et pleurale</i>	14	74	—	84,1
IV. — <i>Tuberculose des poumons, des séreuses pleurales et péritonéales, et des viscères</i>	2	36	—	94,7
V. — <i>Tuberculose généralisée</i>	0	56	—	100,0
VI. — <i>Tuberculose miliaire</i>	1	16	—	94,4

Nous estimons que si l'on s'était contenté de l'examen clinique seul, ces lésions auraient passé inaperçues chez :

39 bovidés de la catégorie I		
74	—	II
16	—	IV et V
16	—	VI

Au total, 145 bovidés sur 257 ayant donné des résultats positifs à la séro-réaction (soit 56,4 p. 100) n'auraient pas été reconnus cliniquement. Notons que la grande majorité des animaux, ayant présenté à l'autopsie une tuberculose généralisée ou miliaire, présentaient un très bon état général; c'est surtout chez ces animaux que, à notre avis, la réaction offre une grande valeur pratique.

Il ressort du tableau qu'un parallélisme indéniable existe entre l'étendue du processus tuberculeux et la fréquence des résultats positifs. Fait à noter, alors que les bovidés atteints de la tuberculose miliaire donnent presque toujours une réaction positive, l'homme montre en pareil cas, le plus souvent, une réaction négative. Les sérum bovins sont d'autant plus fréquemment riches en anticorps que les lésions sont plus étendues. Les cas, dans lesquels le processus tuberculeux est en pleine évolution, sont ceux où la réaction de fixation est la plus nette.

Il est évident que, pour le séro-diagnostic de la tuberculose, le rôle de l'antigène est d'une importance particulière ; de sa valeur, c'est-à-dire, de la facilité avec laquelle il se combine avec l'anticorps, dépend la réussite de la réaction. C'est pourquoi la plupart des tentatives pour utiliser la méthode de fixation dans la tuberculose demeurèrent jusqu'à présent stériles ou ne donnèrent que des résultats peu satisfaisants.

L'antigène employé dans nos recherches était d'abord de provenance humaine. On pouvait se demander si, en employant un antigène d'origine bovine nous n'aurions pas obtenu des résultats encore meilleurs. Nous avons soumis un certain nombre de sérums à la réaction de fixation, en nous servant d'un antigène bovin, préparé de la même façon que l'antigène humain. Or, il résulte de nos expériences, faites simultanément avec les deux antigènes que, contrairement à notre attente, c'est l'antigène humain qui avait mieux fixé que le bovin : si la proportion des cas positifs a été sensiblement la même dans les deux cas, nous avons eu l'impression qu'en présence de l'antigène humain, la réaction de fixation était plus stable. Ces expériences comparatives ont porté sur 88 sérums de bovidés tuberculeux. Sur ce nombre, il y eut 80 positifs avec l'antigène humain et 70 avec l'antigène bovin.

Pour nous résumer :

1^o L'antigène de Besredka fixe l'alexine en présence de sérums des bovidés tuberculeux ; il nous a donné une réaction positive dans 84,5 p. 100 de la totalité de cas (sur 304 sérums).

2^o En présence des sérums des bovidés n'ayant montré à l'autopsie aucune lésion à l'examen macroscopique, l'antigène n'a donné de résultat positif que dans 2,2 p. 100 des cas (sur 90 sérums).

3^o Les résultats fournis par la réaction de fixation sont intimement liés à l'étendue des lésions constatées à l'autopsie. Les bovidés atteints d'une tuberculose très peu avancée (tuberculose ganglionnaire) donnent la réaction positive dans 60 p. 100 des cas ; ceux qui présentent des lésions plus étendues (tuberculose pulmonaire, pleurale, péritonéale, viscérale) réagissent positivement dans 84-95 p. 100 des cas ; enfin, les animaux atteints d'une tuberculose généralisée, mais jouis-

sant d'un bon état général, donnent une réaction positive dans 100 p. 100 des cas.

Nous estimons que la méthode de fixation de l'alexine est appelée à rendre d'importants services dans la lutte contre la tuberculose bovine, et que, dans la méthode d'extinction préconisée par Bang, elle pourra remplacer avantageusement l'ophtalmo-réaction.

En terminant, nous prenons la liberté d'exprimer notre plus profonde reconnaissance à M. le professeur Besredka qui nous donna le sujet de ce travail. Nous remercions également M. le Dr. Morel, directeur sanitaire et MM. les vétérinaires sanitaires de l'abattoir de la Villette, pour leur bienveillance et l'autorisation de prendre part aux autopsies.

INFLUENCE DES VITAMINES ET DES AUXIMONES SUR LA CROISSANCE DES VÉGÉTAUX

par AUGUSTE LUMIÈRE.

I

TRAVAUX ANTÉRIEURS

Eykmann (1) a observé le premier que les poulets nourris exclusivement avec du riz décortiqué maigrissaient progressivement et mouraient en trois ou quatre semaines, alors que l'addition de la cuticule de ce riz à leur régime alimentaire permettait, au contraire, de maintenir l'équilibre vital de ces animaux.

Il en conclut que la cuticule de la graine renferme une substance indispensable à l'entretien du métabolisme normal chez ces oiseaux.

Osborne et Mendel (2), puis Hopkins (3) ont montré en outre que la croissance des jeunes rats ne pouvait être assurée par des rations alimentaires composées de matières protéiques pures, d'hydrates de carbone, de graisses et de sels, même offertes à ces animaux en quantité surabondante. Leur développement ne pouvait se produire qu'en ajoutant à ces aliments de très petites quantités de substances extraites du lait ou de certaines cellules végétales.

Stepp (4) ne put parvenir, d'autre part, à entraîner la vie des souris en les nourrissant au moyen d'aliments épuisés par l'alcool, alors que l'extrait alcoolique résultant de cet épuisement, évaporé à froid et ajouté à nouveau à ces aliments, permet d'assurer leur existence prolongée.

(1) EYKMAN. *Virchow's Archiv*, 1897, **148**, p. 523; *Archiv f. Hyg.*, 1906, p. 130, 170.

(2) OSBORNE et MENDEL. *Carnegie Institute public.*, 1911, p. 156.

(3) HOPKINS. *Journ. Physiol.*, 1912, **44**.

(4) W. STEPP. *Bioch. Zeitsch.*, 1909, p. 452; *Zeitsch. f. Biol.*, 1912, p. 135, 171.

Enfin, quelle que soit la composition d'un régime alimentaire, les animaux qui y sont soumis finissent par mourir si les matériaux qui le constituent ont été chauffés à l'autoclave à 130° pendant un temps suffisant.

Ces différents traitements — décortications, épuisement par l'alcool ou chauffage convenable — semblent donc enlever ou détruire dans les aliments un ou plusieurs principes indispensables à l'entretien de la vie.

Avant la constatation des faits qui viennent d'être sommairement rappelés, on avait toujours considéré que la permanence des fonctions vitales et la croissance des animaux pouvaient être assurées au moyen de rations d'entretien convenables au point de vue énergétique et renfermant des poids suffisants de corps gras, de matières albuminoïdes et de substances hydrocarbonées et salines, alors qu'en réalité certains autres éléments de constitution chimique inconnue et agissant à doses extrêmement faibles, paraissent indispensables à la nutrition normale. Ce sont ces éléments qui ont reçu le nom de *vitamines* ou de *facteurs accessoires ou complémentaires de la croissance et de l'équilibre*.

Frappé de ces observations, le professeur Bottomley (1) s'est demandé si les vitamines ne pourraient pas jouer également un rôle dans le métabolisme des végétaux.

C'est pour vérifier cette hypothèse qu'il entreprit en 1913, au Royal Garden de Kew, une série d'investigations sur les bases suivantes :

Ayant eu l'occasion d'étudier la valeur en tant qu'engraiss de la tourbe de *sphagnum* ensemencée depuis quinze jours avec une culture mixte de micro-organismes aérobies du sol, il remarqua la transformation, par ce traitement bactérien, de l'acide humique en humates solubles; il constata en outre que cette tourbe bactérisée, après stérilisation, constituait un excellent milieu pour le développement des microbes fixateurs de l'azote, et qu'une substance stimulante de la croissance avait pris naissance dans la tourbe ainsi préparée.

(1) W. B. BOTTOMLEY. Some accessory factors on plant growth and nutrition. *Proc. of the Royal Soc. of London. Biol. Sciences*, 1914, p. 237, 240; A bacterial test for plant food accessories (*Auximones*). *Proc. of the Royal Soc. of London*.

Le Dr Rosenheim, du King's College, constata ensuite que les semis de *Primula malacoïdes* étaient, au bout de six semaines de croissance, d'une taille double de celle des plantes témoins, lorsqu'on les avait arrosés à deux reprises avec un extrait aqueux de tourbe bactérisée.

Ces résultats firent supposer à ces auteurs que la stimulation de la croissance pouvait être attribuée à une ou plusieurs substances analogues aux vitamines.

Bottomley crut confirmer ces vues dans les expériences que nous allons sommairement résumer :

Considérant que les facteurs accessoires ou complémentaires de la croissance et de l'équilibre chez les animaux sont solubles dans l'eau et dans l'alcool, il supposa qu'il devait en être de même pour les corps actifs contenus dans la tourbe bactérisée, et il obtint, en effet, par épuisement de cette tourbe à l'alcool, un extrait qui, évaporé dans le vide et repris par l'eau, fut reconnu pour un stimulant efficace de la cellule végétale.

Dans un milieu renfermant : 1 gramme de mannite, 0 gr. 20 de $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ et de CaCO_3 et 0,02 de SO_4Mg pour 100 cent. cubes d'eau distillée, Bottomley ajoutait 1 cent. cube d'une solution aqueuse de cet extrait amené à une dilution correspondant à 10 grammes de tourbe bactérisée par litre; puis, après stérilisation, le liquide était ensemencé avec l'*Azotobacter chroococcum*. Après huit jours d'incubation à 26°, le poids de l'azote fixé était environ quatre fois plus considérable dans les cultures renfermant l'extrait de tourbe bactérisée que dans les cultures témoins faites avec le même milieu, mais sans addition d'extrait.

Cooper et Funk (1) avaient montré en 1911 que la substance curative de l'avitaminose chez le poulet était entièrement précipitée par l'acide phosphotungstique, et Bottomley, continuant ses recherches dans une voie parallèle, put séparer par un procédé d'extraction identique la fraction de l'extrait de tourbe précipitable par ce réactif. Le traitement de la combinaison phosphotungstique par la baryte conduisit à une matière douée de propriétés stimulantes vis-à-vis des végétaux,

(1) COOPER et FUNK. *Lancet*, 1911, p. 1267.

mais à un degré beaucoup moindre cependant que l'extrait aqueux total.

L'auteur précité en fit la démonstration en cultivant la *Lemma minor* sur le liquide minéral de Detmer, additionné d'extrait provenant de la combinaison phosphotungstique (dix-sept parties d'extrait sec par million de parties de solution).

Les résultats obtenus après trois mois et demi d'expériences montrent une multiplication plus rapide sur le liquide additionné d'extrait que sur la solution témoin, résultat beaucoup moins favorable cependant qu'en employant l'extrait de tourbe bactérisée sans aucun traitement.

Bottomley désigne sous le nom d'*Auximones* (auximônes : exaltant le développement) ces substances non chimiquement définies favorisant la croissance des végétaux.

En 1917, Mockeridge (1) donna plus d'extension encore à ces essais en les appliquant à l'étude des différentes phases du cycle de transformation que subissent les matières azotées dans le sol.

Les conclusions de cet auteur peuvent se résumer ainsi : les substances solubles extraites de la tourbe bactérisée augmentent la vitesse de fixation de l'azote et la nitrification, diminuent la dénitrification et paraissent sans effet appréciable sur la formation des composés ammoniacaux dans le sol.

D'autre part, C. Jordan Lloyd (2), Cordon et T. C. Hyne (3), Sydney W. Cole et D. Jordan Lloyd (4), MM. H. Agulhon et Legroux (5) ont attribué à des vitamines les résultats favorables qu'ils ont obtenus en cultivant le gonocoque, le méningocoque ou le bacille de Pfeiffer sur certains milieux renfermant des matières organiques complexes.

Enfin, M. Linossier (6) cultivant divers 'champignons' :

(1) FLORENCE A. MOCKERIDGE. Some effects of organic growth promoting substances (*Auximones*) on the soil organisms concerned in the nitrogen cycle *Proc. of the Royal Soc. of London. Biol. Sc.*, 89, série 8, p. 508, 533.

(2) C. JORDAN LLOYD. *British Med. Journ.*, 1916, 2, p. 143.

(3) M. H. CORDON et T. C. HYNE. *British Med. Journ.*, 1916, 2, p. 678.

(4) SYDNEY W. COLE et D. JORDAN LLOYD. *Journ. of Path. and. Bact.* 1916, 21, p. 267.

(5) H. AGULHON et LEGROUX. *C. R. Acad. des Sc.*, 21 octobre 1918, p. 597.

(6) LINOSSIER, Les vitamines et les champignons. *C. R. Soc. de Biol.*, 12 avril 1919, p. 381 et 20 mars 1920, p. 346.

Oidium lactis, *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum*, *Mycoderma vini*, etc., dans des bouillons pauvres, a constaté que, pour quelques-uns d'entre eux, l'addition d'une faible quantité d'infusion de raisins secs, riche en vitamines, augmentait les récoltes d'une manière importante; d'après cet auteur, certaines espèces de champignons pourraient se passer de vitamines, tandis que d'autres exigeraient la présence de ces substances pour se développer.

L'influence de ces vitamines se ferait sentir principalement dans le cas où la vitalité des micro-organismes est atténuée.

II

Toutes ces expériences ne satisfont pas l'esprit, à notre sens, et ne constituent pas une démonstration péremptoire de la nécessité des vitamines pour le développement des végétaux. Mais avant de les discuter, il est indispensable de se mettre d'accord sur le sens du mot *Vitamine*. M. Linossier s'explique de la manière suivante, sur la signification qu'il attache à ce terme :

« Je répète que je prends le mot vitamine dans son sens le plus large — substances *mal définies, nécessaires* à très petite dose au développement et à l'entretien d'un être vivant. Depuis que l'attention a été appelée sur ces substances, chaque auteur, guidé par ses conceptions personnelles, tend à restreindre la signification du mot. Il faudra y arriver certainement un jour; mais actuellement, nous ne sommes pas assez documentés pour formuler une définition *ne varietur*, et il me paraît inutile de changer un nom médiocre sans doute, mais que nous ne serions pas sûrs de remplacer par un meilleur. A des notions vagues doivent correspondre des dénominations vagues. Cela soit dit parce qu'on a contesté la valeur du mot vitamine dans le cas particulier qui a fait l'objet de ma première communication et de celle-ci (1). »

Nous admettons parfaitement ce raisonnement, et acceptons, faute de mieux, la définition du néologisme *Vitamine* à laquelle

(1) LINOSSIER. *C. R. Soc. de Biol.*, 20 mars 1920, p. 346.

M. Linossier s'est rallié; mais il ne semble pas alors qu'on puisse faire rentrer dans le cadre de cette définition les Auximones de Bottomley et les matériaux utiles aux champignons dont M. Linossier s'est occupé.

En effet, le caractère principal des vitamines est d'être nécessaires, nous ajouterons même indispensables à la vie; si nous les supprimons de la nourriture des animaux, ces animaux meurent infailliblement.

Si elles sont nécessaires, cela veut dire qu'il n'est pas possible de les remplacer par autre chose, par d'autres produits de constitution chimique connue. Si leur substitution pouvait être réalisée, elles ne seraient plus nécessaires, indispensables: ce ne seraient plus des vitamines.

Or, les extraits de tourbe bactérisée peuvent être remplacés par des composés définis, et il est facile de cultiver des champignons sur des milieux convenables dépourvus de toute substance vitaminique.

Raulin n'a-t-il pas montré, au cours de ses belles recherches poursuivies dès 1870 (1), que l'*Aspergillus niger* se développe abondamment au sein d'une solution ne renfermant que des substances de constitution chimique parfaitement déterminée?

D'ailleurs, si nous supprimons de cette solution un certain nombre des substances qu'elle renferme, la végétation sera moins abondante, mais pourra s'effectuer néanmoins.

Les exigences de la cellule végétale sont remarquablement réduites: elle s'accommode des aliments les plus simples et les plus divers. Avec l'eau, l'air et quelques sels métalliques, elle construit les molécules organiques les plus compliquées, *sans l'intervention d'aucune vitamine*. Sa puissance de synthèse est vraiment extraordinaire.

On sait avec quelle fréquence des solutions ne renfermant qu'un seul composé chimique défini, métallique ou organique, peuvent être envahies par des moisissures. En voici un exemple personnel :

En vue d'expériences qui n'avaient en principe rien de commun avec les investigations qui sont l'objet du présent travail,

(1) Raulin, *Etudes chimiques sur la végétation. Recherches sur le développement d'une mucépidinée dans un milieu artificiel. Annales des Sc. natur., Botanique*, 1870.

nous avions préparé, l'an dernier, des dissolutions à 1 ou 2 p. 100, suivant leur solubilité, de différents corps dans du sérum physiologique (NaCl à 8 p. 100). Ces solutions avaient été abandonnés à la température du laboratoire dans des flacons bouchés sans précautions spéciales. Au bout de six mois, un grand nombre d'entre elles était altéré par les moisissures plus ou moins abondantes, et ce développement mycélien s'était produit aussi bien dans celles de nos solutions qui ne renfermaient que des corps minéraux, tel que du phosphate de chaux ou de l'hypophosphite de sodium, etc... que dans celles qui contenaient les substances organiques les plus différentes, comme l'acide lactique, le benzoate de sodium, l'acétate de calcium, la phloroglucine, le sulfocyanate d'hexaméthylène tétramine, le sulfocinat de sodium, etc... Un grand nombre de ces liqueurs s'était donc comporté comme des milieux de culture. Bien que complètement privés de vitamines, ces milieux avaient pu, par le seul moyen d'éléments simples, carbone, hydrogène, oxygène et azote, empruntés à l'air et à l'eau distillée, assurer la synthèse des corps compliqués formant les tissus des végétaux inférieurs.

Et ce ne sont pas seulement certains êtres aussi simples que les microbes et les moisissures, qui sont capables de se multiplier dans des solutions ne contenant que des composés minéraux; mais les plantes les plus complexes peuvent elles-mêmes se contenter de semblables milieux dépourvus de tout corps organique.

Mazé (1) a pu réaliser l'évolution complète du maïs dans une solution ne refermant que des sels inorganiques — nitrate de sodium, phosphate de potassium, sulfate de magnésium, sulfate ferreux, silicate de potassium, chlorure de zinc, chlorure de manganèse, carbonate de calcium, fluorure de sodium, sulfate d'aluminium, borate de sodium et iodure de potassium, comportant au total quinze corps simples, indépendamment de l'oxygène, de l'hydrogène, de l'azote et du carbone empruntés à l'eau et à l'air.

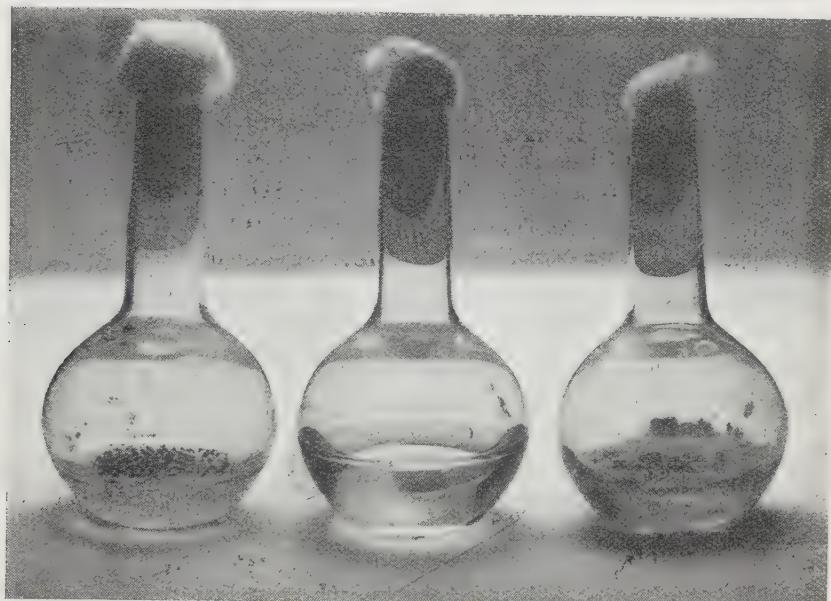
On ne comprend guère que les exigences des végétaux supé-

(1) MAZÉ, Recherche d'une solution purement minérale, capable d'assurer l'évolution complète du maïs cultivé à l'abri des microbes. *Ces Annales*, mars 1919, p. 139.

rieurs, comme le maïs, puissent se limiter strictement à des aliments minéraux, alors que la culture de quelques microbes et de quelques plantes seulement nécessiterait l'intervention de vitamines pour proliférer.

Dans leurs expériences sur les végétaux, les auteurs précédemment cités se sont adressés à des milieux de culture pauvres, ne renfermant point les aliments convenables pour

FIGURE 4.



Raisins secs.

Témoin.

Winogradsky.

assurer une abondante pullulation, et, du moment que, dans de tels milieux, les champignons peuvent néanmoins proliférer, il faut bien admettre que l'addition d'un certain nombre de produits, définis ou non, est capable d'améliorer considérablement les qualités nutritives de ces milieux, sans que pour cela ces produits soient des vitamines.

Nous avons vérifié ce fait par l'expérience suivante : Ayant réparti le bouillon à base de tartrate d'ammoniaque et de glycérine, employé par M. Linossier, dans une série de ballons Pasteur, nous avons ajouté dans les uns des sels minéraux

composant les solutions de Winogradsky et de Mazé, ne renfermant que des sels inorganiques, et dans les autres, quelques gouttes d'infusion de raisins secs. Ces milieux ont étéensemencés en même temps que la solution mère témoin, avec le *Penicillium glaucum*; les cultures comparatives, photographiées huit jours après l'ensemencement, sont reproduites dans la figure 1 et montrent que la végétation est plus abondante dans les solutions salines convenables que dans le bouillon additionné d'infusion de raisins secs (fig. 1).

Ces résultats démontrent que les vitamines ne sont nullement nécessaires à la croissance des végétaux.

Si l'on voulait admettre, non pas même la nécessité, ce qui serait absolument contraire à l'expérience précédente, mais seulement l'utilité des vitamines pour assurer le métabolisme de la cellule végétale, il faudrait démontrer : 1^o que les matériaux de constitution inconnue provenant, soit de la tourbe bactérisée de Bottomley, soit de l'infusion de raisins secs de M. Linossier, renferment des vitamines; 2^o que ce ne sont pas les corps organiques ou minéraux autres que ces vitamines contenus aussi dans ces matières qui exercent l'action favorisante constatée.

Ces preuves ne ressortent nullement des expériences instituées par ces auteurs. C'est du moins ce que nous pensons pouvoir prouver en discutant les deux questions que nous venons de soulever.

A. — L'infusion de raisins secs de M. Linossier et l'extrait de tourbe bactérisée de Bottomley renferment-ils des vitamines?

Il convient d'observer tout d'abord que ces substances fertilisantes ont été employées après chauffage à 130°, et on admet généralement que les vitamines sont détruites à cette température. Quelques expérimentateurs cependant ont remarqué que la stérilisation ne supprimait pas toujours d'une façon complète les propriétés antiscorbutiques des aliments.

D'après Hant, Steenbock et Smith (1), le lait stérilisé à 120°,

(1) A. B. HANT, H. STEENBOCK et D. W. SMITH, Action de la chaleur sur les propriétés antiscorbutiques de quelques produits lactés. *Journ. of Biol. Chem.* 1919, p. 305, 324.

le lait commercial condensé et sucré, et la poudre de lait perdraient bien leurs propriétés antiscorbutiques employés à la même dose de lait cru qui protège les animaux; mais en augmentant la proportion de produits chauffés, on parviendrait cependant à préserver ces animaux des accidents de la carence.

Richet (1) a constaté en outre que des chiens nourris exclusivement avec de la viande stérilisée à 135° meurent rapidement, tandis que si leur ration comprend un mélange de pain et de viande stérilisés à la même température, leur équilibre vital peut être maintenu.

Daniels et Mc Clurg (2) ont constaté que les vitamines résistent à la chaleur en milieu neutre ou acide, mais sont altérées par chauffage lorsque leur réaction est alcaline.

La destruction des substances vitaminiques par la stérilisation à l'autoclave à 130° ne semble donc pas toujours certaine, et nous ne pouvons pas, *a priori*, admettre que les auximones et l'infusion de raisins secs chauffés dans ces conditions ne renferment plus de produits vitaminiques.

Nous avons cherché à élucider ce problème, non en partant de l'extrait de tourbe bactérisée, parce que nous avons éprouvé des difficultés à nous procurer les matériaux nécessaires à l'expérience, mais en utilisant l'infusion de raisins secs; nous avons pu, après stérilisation à 135° pendant 2 heures et évaporation à consistance sirupeuse, administrer cette préparation à des pigeons atteints de troubles cérébelleux aigus, et obtenir une amélioration passagère de l'état de ces animaux, montrant que les corps antibéribériques n'avaient pas été complètement détruits par le chauffage.

Cependant, cet extrait est impuissant contre les accidents scorbutiques du pigeon qui meurt malgré son administration dès l'apparition des premiers symptômes de carence.

M. Linossier a donc, à juste titre, considéré que l'infusion de raisins secs stérilisée pouvait encore renfermer quelques produits vitaminiques, mais ces produits semblent altérés et ne

(1) RICHET. *Soc. de Biol.*, juin 1919.

(2) AMY L. DANIELS et NELLIE I. MC CLURG, Influence of high temperature and dilute alkalies on the antineuritic properties of foods. *Journ. of Biol. Chem.*, 1919, p. 201, 215.

jouissent plus de l'activité des extraits non stérilisés. Il est possible qu'il en soit de même pour les Auximones de Bottomley.

B. — Le pouvoir fertilisant des extraits de tourbe bactérisée et de raisins secs est-il dû aux résidus de vitamines, ou aux autres produits minéraux ou organiques qu'ils peuvent renfermer ?

On sait que certains liquides de provenance humorale ou cellulaire, comme le sérum des animaux et le suc frais des plantes riches en vitamines, contiennent des bactériolysines qui entravent le développement des microbes : ces bactériolysines sont détruites par chauffage à 100°.

Ce fait paraît encore aller à l'encontre de l'opinion qui accorde aux vitamines un pouvoir accélérateur dans la végétation.

Nous avons remarqué souvent que certaines espèces bactériennes poussent mieux sur des milieux qui ont été stérilisés à l'autoclave que sur ceux qui ont été filtrés à la bougie. La stérilisation par la chaleur, qui s'accompagne en général, sinon toujours, de la détérioration complète des vitamines, et qui réalise en tout cas leur atténuation et leur destruction partielle, est au contraire favorable à la végétation microbienne.

L'expérience suivante le démontre nettement.

Nous nous sommes adressé pour cette investigation à un milieu végétal renfermant des éléments non coagulables par la chaleur, afin de ne pas précipiter, par le passage à l'autoclave, une fraction de ces matériaux alimentaires.

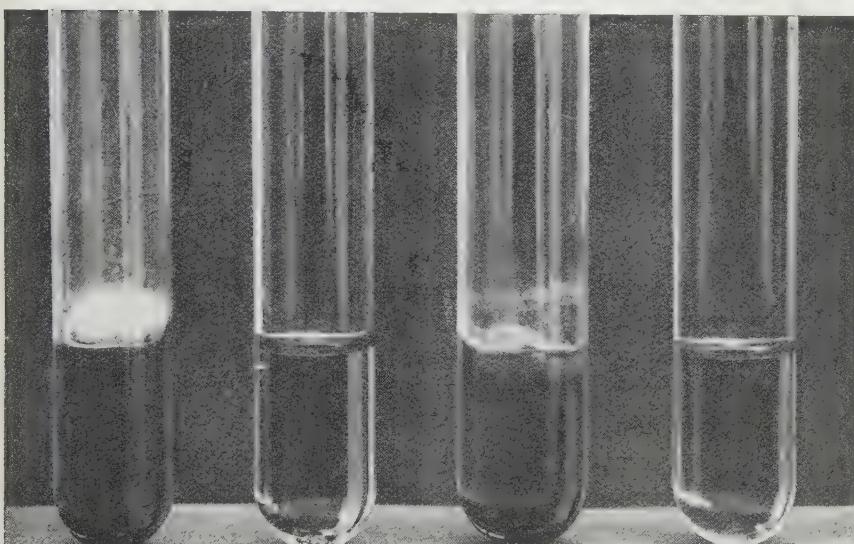
Nous avions utilisé antérieurement, pour un autre emploi, un bouillon préparé au moyen de l'*Amanita muscaria*, hachée et mise en macération à 37° dans son poids d'eau distillée, qui nous a paru convenir à cette démonstration.

Le bouillon a été divisé en deux parties : l'une des portions a été stérilisée à 130°, et l'autre filtrée sur bougie F. Les tubes renfermant ces liquides ont été abandonnés à l'air dans l'étuve à 37°, sans être bouchés. Au bout d'une semaine, les tubes renfermant le bouillon chauffé étaient abondamment recouverts de végétations, tandis qu'aucun micro-organisme ne s'était encore développé sur les tubes non stérilisés par la chaleur,

ainsi que le montre la figure 2. Ce n'est que plus tard qu'ils se sont contaminés.

D'autre part, si, au lieu de recourir à l'infusion de raisins secs, comme dans l'expérience de M. Linossier, nous nous adressons aux extraits de levure de bière ou aux extraits de cuticules de graines, préalablement reconnus comme étant très riches en vitamines et susceptibles de guérir très rapidement

FIGURE 2.



Stérilisé à 130°. Filtré à la bougie. Stérilisé à 130°. Filtré à la bougie.

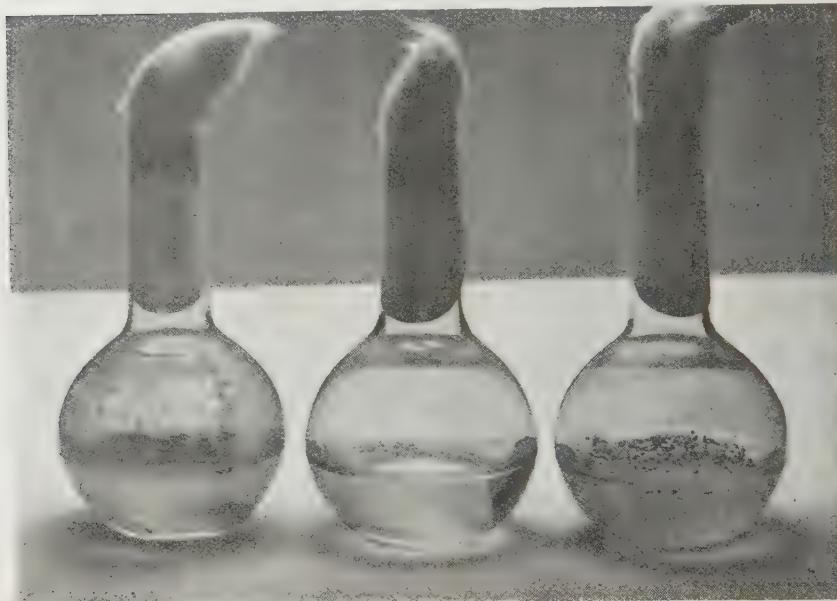
les troubles nerveux du pigeon carencé, nous pouvons constater qu'après chauffage à 130°, ces extraits perdent complètement toutes leurs propriétés curatives de l'avitaminose. Or les bouillons préparés avec des produits ainsi modifiés par la chaleur ont cependant conservé leur pouvoir excitant de la croissance des champignons.

La figure 3 montre l'état de cultures d'*Aspergillus niger* huit jours après l'ensemencement. Le ballon témoin 1 renfermant la solution de tartrate d'ammoniaque et de glycérine ne présente que des traces de végétation, tandis que le ballon 3, dans

lequel ce milieu a été additionné d'extrait de levure de bière, ne contenant plus de vitamines actives pour les animaux, montre une prolifération très abondante du champignon. Comparativement, l'addition d'infusion de raisins secs, ballon 2, est notablement moins favorable au développement de micro-organismes, bien qu'il renferme encore des substances vitaminiques.

Nous avons poussé l'expérience plus loin encore en carboni-

FIGURE 3.



Extrait de levure
stérilisé à 135°.

Témoin.

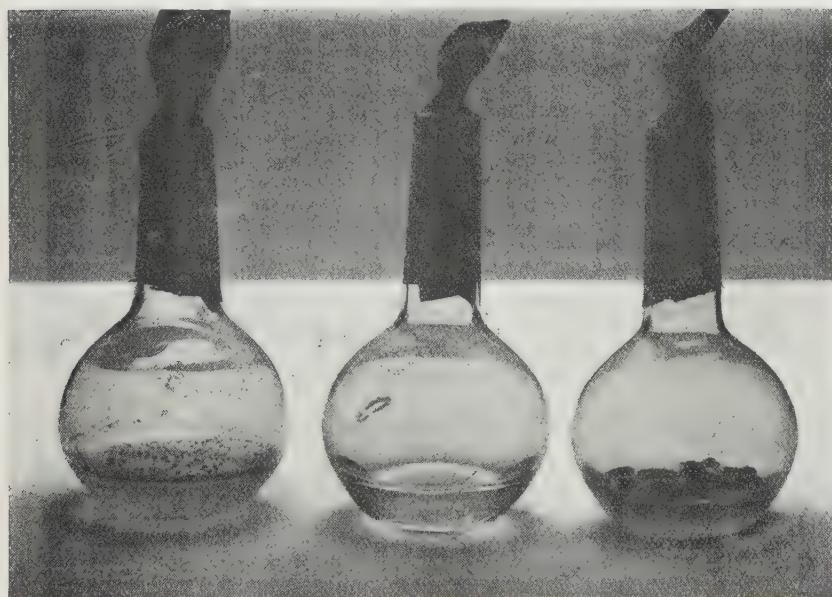
Raisins secs.

sant les extraits de levure et de raisins secs à 230°, et les bouillons qu'ils fournissent, malgré cette profonde altération, sont encore sensiblement aussi actifs que ceux qui renferment les produits frais. Il est bien difficile d'admettre que les vitamines, dont nous connaissons la fragilité, puissent subsister à de telles températures. Nous ne pouvons pas davantage supposer qu'il existe deux classes de ces corps, l'une comprenant les vitamines actives chez les animaux, indispensables au maintien de leur équilibre vital et sensibles à la chaleur, et l'autre,

toute différente comme propriétés, comprenant des substances très résistantes même à 250°, agissant seulement sur la nutrition des végétaux et facilement remplacables par des composés chimiques définis.

Nous reproduisons ci-dessous (fig. 4), l'état de cultures comparatives d'*Aspergillus niger* développées dans le mélange de tartrate d'ammoniaque et de glycérine, avec et sans addition

FIGURE 4.



Raisins secs.

Témoin.

Levure carbonisée.

de levure carbonisée. Six jours après l'ensemencement, le ballon témoin n'a presque pas végété, tandis que la mucédinée s'est beaucoup plus abondamment développée dans le liquide auquel on a ajouté un peu de levure carbonisée que dans celui qui a été additionné d'extrait de raisins secs.

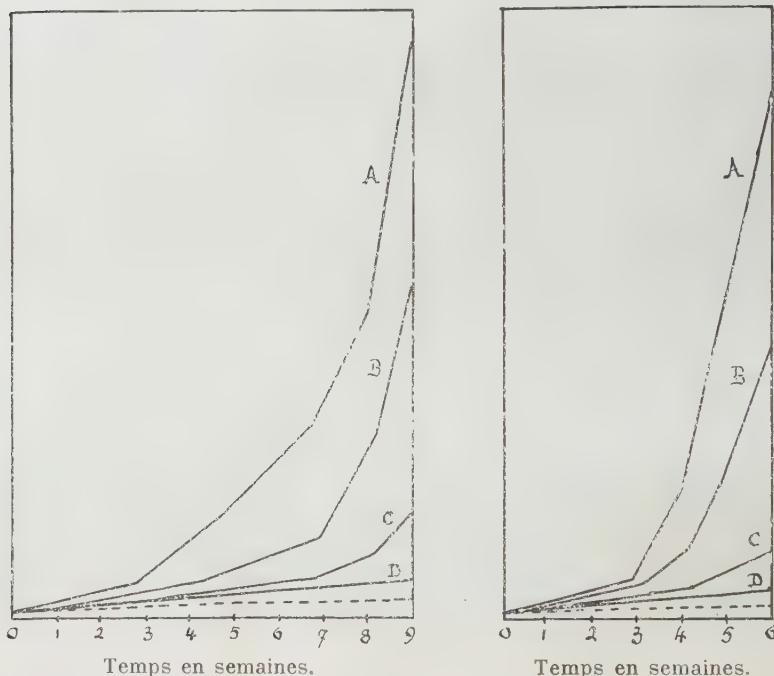
On sait d'autre part que l'acide phosphotungstique précipite les vitamines contenues dans les extraits de levure, de cuticule et d'autres cellules et tissus végétaux et animaux.

Après cette précipitation, le liquide résiduel ne renferme

plus de substances actives susceptibles de combattre les accidents de l'avitaminose du pigeon.

Par contre, la fraction phosphotungstique précipitée, traitée par la baryte pour en éliminer les éléments métalliques, libère les substances actives. Or Bottomley, dans ses cultures de *Lemna minor* sur liquide de Detmer, constate que l'extrait

FIGURE 5.
Nombre de plantes. Poids des plantes.



A = Solution de Detmer + extract aqueux de tourbe bactérisée.
 B = — + extract aqueux de tourbe bactérisée. débarrassé d'acide humique.
 C = — + extract alcoolique de tourbe bactérisée.
 D = — + fraction phosphotungstique.
 - - - Liquide de Detmer seul.

aqueux total de tourbe bactérisée donne des résultats incomparablement supérieurs à ceux que fournit l'emploi de la fraction phosphotungstique; puisque c'est cette fraction qui renferme seule les agents antibéribériques on peut en conclure que ce ne sont pas ces vitamines qui sont favorables au développement

FIG. 6. — Solution de Raulin.

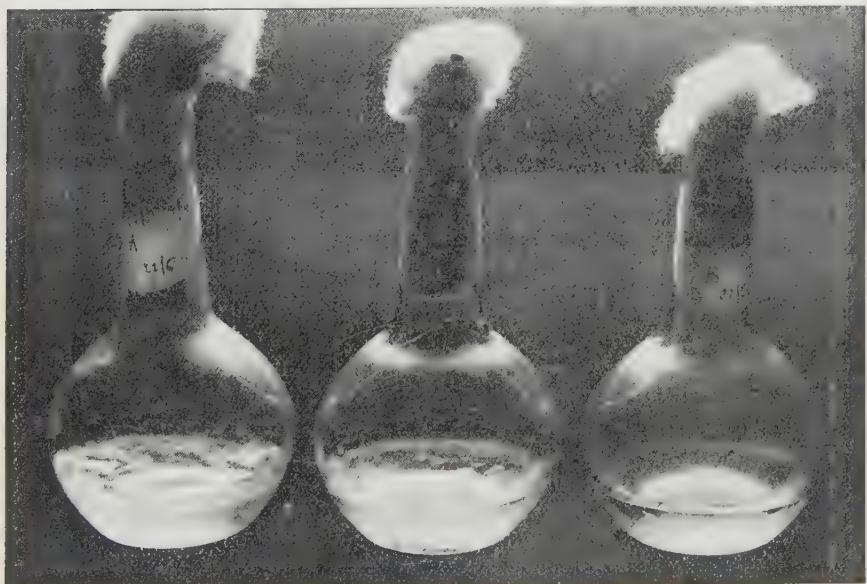


Portion résiduelle sans
vitamines.

Témoin.

Fraction phosphotungstique riche en vitamines.

FIG. 7. — Solution de Winogradsky.



Portion résiduelle sans
vitamines.

Témoin.

Fraction phosphéotungstique riche en vitamines.

des plantes, mais les autres substances non précipitables par le réactif spécifique des vitamines connues.

Les courbes reproduites ci-dessus (fig. 5), empruntées au travail de Bottomley, viennent précisément à l'appui de cette observation, en montrant que les corps retirés du précipité phosphotungstique ne sont guère plus propices à la multiplication de la *Lemna minor* que le liquide minéral incomplet de Detmer employé sans aucune addition.

Nous avons répété cette expérience sur les moisissures en opérant comme suit :

Un extrait aqueux de levure de bière a été traité par l'acide phosphotungstique, et le précipité recueilli, lavé, décomposé par la baryte, a donné un liquide renfermant les vitamines actives pour les animaux ; la liqueur résiduelle, non précipitable par le réactif et complètement inefficace pour le traitement de la polynévrite des oiseaux, a été recueillie d'autre part, puis ces deux portions ont été ajoutées aux différents milieux artificiels suivants : Liquide de Raulin, Solution de Detmer, Solution de Winogradsky, puis ensemencées comparativement à des témoins avec le *Penicillium glaucum*, l'*Aspergillus niger* et le *Rhizopus nigricans*.

La fraction phosphotungstique, riche en matières curatives de l'avitaminose, ralentit d'une manière constante la végétation, comme on peut s'en rendre compte en examinant les figures 6 et 7.

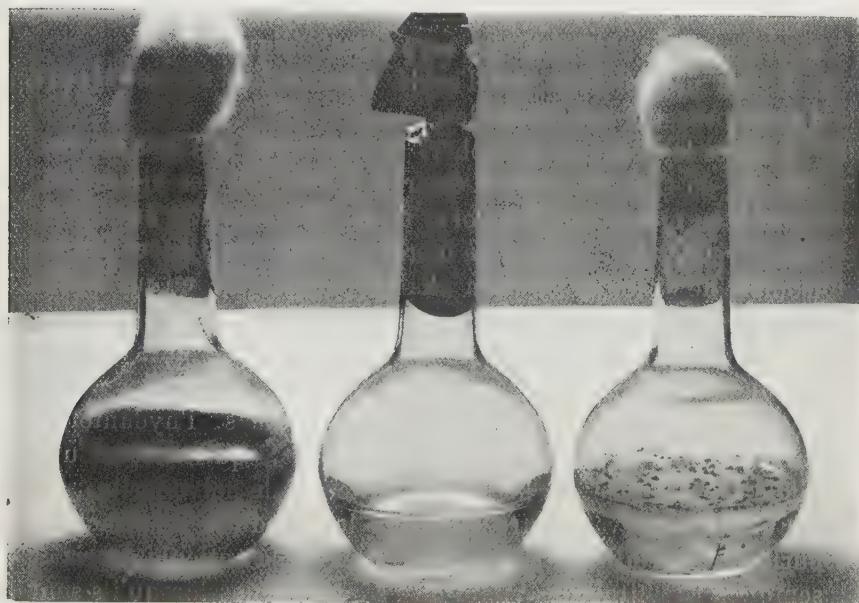
La portion de l'extrait qui renferme les vitamines indispensables aux animaux paralyse le développement des cultures, tandis que l'autre partie, exempte de vitamines, exerce une action variable suivant les milieux employés et les micro-organismes ensemencés ; favorisante pour les bouillons pauvres, elle est en général inutile quand elle est ajoutée aux milieux artificiels appropriés.

Les vitamines seraient donc nuisibles au développement des végétaux d'après ces expériences.

Rappelons que, quand on fait passer un extrait vitaminique sur de la terre à foulon (Harden et Silva) ou sur un précipité de silicate d'alumine hydraté, désigné sous le nom de réactif de Lloyd (Seidell), les vitamines sont retenues par les particules insolubles très divisées constituant la masse argileuse, et le

liquide qui filtre au travers de ces substances est complètement privé de tout corps antinévrifique. Partant d'extrait de levure, nous avons ajouté le filtrat ainsi obtenu à la solution de glycérine et de tartrate d'ammoniaque, et nous avons pu nous assurer que, bien que la liqueur ne renferme plus de vitamines, ses propriétés fertilisantes pour les moisissures

FIG. 8. — *Aspergillus niger*.



Après filtration.

Témoin.

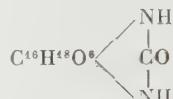
Non filtré.

La terre à foulon a retenu une substance nuisible à la végétation, en même temps que les vitamines.

étaient parfaitement conservées, ainsi qu'on peut en juger par l'examen des cultures comparatives, reproduites dans la figure 8.

Il est à remarquer que la végétation est plus abondante dans le liquide qui a été filtré qu'avant son passage sur la terre à foulon. En retenant les vitamines, on a donc éliminé une substance nuisible et, d'après les expériences précédentes, il semble bien que cette substance nuisible soit la vitamine elle-même.

On sait encore que Funk (1) a isolé de la pellicule argentée qui constitue l'enveloppe du grain de riz, une base pyrimidique, fondant à 233°, qui possède la propriété de guérir les accidents nerveux du béribéri expérimental : ce composé, défini, cristallisé, répond à la formule :



et présente les réactions des corps alcaloïdiques.

Il est précipitable par l'acide phosphotungstique et par d'autres réactifs des alcaloïdes.

D'après les travaux de Robert Williams (2), d'Atherton Seidel (3), de Carl Voegtlin et George White (4), les vitamines, ou tout au moins certains corps doués de propriétés antinévrétiques retirés de la levure de bière, seraient constituées par un isomère de l'adénine, que la chaleur transforme en un dérivé tautomérique inactif.

D'autres substances, voisines au point de vue de leurs groupes chimiques fonctionnels, auraient également des propriétés analogues, telles sont certaines oxypyridines, l'hydantoïne, l'allantoïne, l'uracile, la paraxanthine, etc., qui exercent une influence marquée sur les pigeons atteints de polynévrite.

Funk a observé d'autre part que les produits d'extraction, purifiés et cristallisés, qu'il avait retirés de la cuticule du riz et semblent constituer les vitamines, sont toxiques lorsqu'ils sont administrés aux animaux à trop fortes doses.

Toutes ces propriétés, toutes ces considérations chimiques nous amènent à rapprocher les vitamines des alcaloïdes : elles ont d'ailleurs la même origine et, comme nous croyons l'avoir démontré (5), ces corps alcaloïdiques agissent en excitant les

(1) FUNK. *Journ of Physiol.*, 1911, 1912, p. 395, 401.

(2) ROBERT R. WILLIAMS. *Journ. of Biol. Chem.*, 1916, p. 437, 445; Washington, U. S. Dep. of Agric. Bureau of Chem.

(3) ATHERTON SEIDELL. *U. S. Publ. Health Reports*, **31**, no 364

(4) CARL VOEGELIN et C. WHITE. *Journ. of Pharmacology and Exper. Therap.*, décembre 1916, p. 155-166.

(5) AUG. LUMIÈRE, Sur les accidents polynévrítiques et cérébelleux chez le pigeon soumis au régime du riz décortiqué. *C. R. Acad. de Méd.* 20 janvier 1920. — Sur l'anorexie chez le pigeon nourri au riz décortiqué, et le rôle des vitamines dans la nutrition. *C. R. Acad. de Méd.*, 30 mars 1920. — Sur le rôle des vitamines dans la nutrition. *La Presse Médicale*, 8 mai 1920.

glandes à sécrétion externe et, en permettant l'accomplissement de la phase digestive dans la nutrition, préparent ainsi l'assimilation.

La nature alcaloïdique des vitamines actives pour les animaux explique non seulement leur inutilité pour les plantes, mais même l'effet paralysant qu'elles peuvent exercer sur la végétation lorsqu'elles sont ajoutées à des milieux nutritifs convenables et à dose suffisante.

Il résulte de ces expériences que tous les caractères des vitamines constituant les propriétés spécifiques propres à les définir : indispensabilité, impossibilité de remplacement par des composés chimiques définis, sensibilité à la chaleur, précipitation par l'acide phosphotungstique et par les réactifs des alcaloïdes, absorption par la terre à foulon et le réactif de Lloyd, manquent aux substances qui peuvent, dans des milieux de culture pauvres, insuffisants, et *dans ces milieux seulement*, améliorer la croissance des végétaux.

Ces substances stimulantes occasionnelles ne semblent donc pas pouvoir être assimilées aux vitamines.

L'une des raisons qui les ont fait considérer comme telles provient du fait qu'elles agissent à dose extrêmement faible, et Bottomley accepte ce fait en faveur de sa thèse.

« Il est difficile de comprendre, écrit-il, comment l'addition de quantités de matières organiques aussi petites que 43 parties à une solution de culture contenant déjà 5.500 parties de sels nutritifs minéraux puisse produire les résultats obtenus, si elle ne représente qu'un nouvel apport d'aliments pour les végétaux. »

Or, ce n'est pas par la quantité de produits alimentaires que le milieu minéral choisi par Bottomley (liquide Detmer) se trouve insuffisant, mais par sa pauvreté qualitative, certains éléments minéraux utiles manquant sans doute à la solution employée.

D'ailleurs, d'autres faits plus précis montrent que l'argument de Bottomley ne saurait être retenu.

Raulin a constaté qu'en éliminant le zinc du milieu artificiel qu'il a composé pour la culture de l'*Aspergillus niger*, la récolte de cet organisme, toutes conditions égales d'autre part, n'est plus que le dixième de celle qu'on peut recueillir en laissant

subsister cet élément métallique ; or, le poids du zinc renfermé dans un litre de liquide de Raulin n'est que de 0,01 centigr. (0,07 de ZnCl pour 1.500 grammes de solution) alors que le poids total de matériaux nutritifs qui s'y trouvent dissous atteint 53 gr. 37 ; le zinc qui intervient ne représente donc dans ce poids que 1/3.337 des aliments solides contenus dans la solution, quantité douze fois plus faible que celle qui fait considérer par Bottomley l'extrait de tourbe comme une vitamine, et cependant le zinc ne saurait être assimilé à ces substances !

Dans les expériences de Mazé, le fluor indispensable à l'évolution complète du maïs cultivé en solution purement minérale ne représente que la 1/3.000 partie des sels renfermés dans la liqueur culturale, et le fluorure de sodium ne peut être davantage assimilé à une vitamine.

Le raisonnement de Bottomley, basé sur la petitesse des doses, ne saurait donc être retenu.

Il se peut d'ailleurs que certains éléments, agissant en proportion très minime, interviennent pour améliorer la végétation en paralysant l'effet des toxines sécrétées par les cellules. C'est ce que Mazé a fait ressortir dans son étude sur la chlorose du maïs (1).

En réalité, il est possible, probable même, qu'en offrant à des végétaux des substances déjà élaborées par d'autres végétaux, on facilite, dans certains cas et dans une certaine mesure, l'assimilation de quelques matériaux et on favorise la croissance des plantes qui peuvent disposer d'aliments ainsi préparés ; mais ce fait n'autorise pas à considérer ces aliments comme des vitamines, puisqu'ils n'en possèdent aucune des propriétés caractéristiques.

CONCLUSIONS

1^o Les vitamines ne sont nullement nécessaires au développement des végétaux, qui peuvent faire leur croissance complète dans des milieux chimiquement définis, et même dans

(1) MAZÉ, Chlorose toxique du maïs. La sécrétion interne et la résistance naturelle des végétaux supérieurs aux intoxications. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1916, p. 1059.

des solutions purement minérales convenablement choisies.

2^o Dans des milieux pauvres et insuffisants pour assurer une abondante et rapide végétation, la fertilisation par des extraits organiques, renfermant des vitamines plus ou moins altérées, ne semble pas due à ces vitamines mêmes, mais aux produits qui les accompagnent.

3^o L'addition de ces extraits organiques aux milieux pauvres peut être avantageusement remplacée par l'adjonction de sels minéraux chimiquement définis, tout au moins dans le cas des mucédinées qui ont été utilisées au cours de nos expériences.

Le Gérant : G. MASSON.

